

Die Rolle von ICOS auf die B-Zelldifferenzierung in einem *in vivo* Modell

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Anja Christina Dahler

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Markschies

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Andreas Radbruch
2. Dr. Michal Or-Guil
3. Prof. Dr. Richard Kroccek

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2009

Zusammenfassung

Der induzierbare Kostimulator ICOS ist ein zu CD28 strukturell und funktionell verwandtes Molekül, das eine wichtige regulatorische Rolle bei der T-Zelleffektorfunktion spielt. Eine ICOS-Defizienz beim Mensch manifestiert sich in einer schweren Störung des humoralen Immunsystems. Eine murine ICOS-Defizienz führt ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der T-Zell-abhängigen humoralen Immunantwort, bei der kleinere oder komplett fehlende Keimzentren zu beobachten sind. Vielfältige *in vitro* und *in vivo* Studien führten diese Phänomene auf die beeinträchtigte Regulation von Kommunikationsmolekülen der Zelloberfläche und der Zytokinexpression durch ICOS-defiziente T-Zellen zurück. Ein Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von ICOS KO Mäusen den Einfluss von ICOS auf die B-Zellentwicklung genauer zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass ICOS erst in der späten Phase der B-Zellentwicklung eine Rolle spielt, da der Interaktionspartner von ICOS erst auf transitionellen B-Zellen der Milz exprimiert wird. Durch die Etablierung eines *in vivo* adoptiven T-B Transfermodells konnte die Rolle von ICOS erstmalig bei der T-B Kooperation in den frühen Phasen der Immunantwort auf der Ebene Antigen-spezifischer T- und B-Zellen aufgeklärt werden. Dabei konnte beobachtet werden, dass eine ICOS-Defizienz einen dramatischen Einfluss auf die B-Zellexpansion und B-Zellproliferation hat. Zum ersten Mal konnte *in vivo* gezeigt werden, dass ICOS bei der T-B Kooperation eine entscheidende Rolle bei der Regulation diverser Oberflächenmarker der B-Zellen spielt, wodurch die B-Zellaktivierung, B-Zellproliferation und B-Zelldifferenzierung bei der Keimzentrums- und Plasmazellreaktion beeinflusst werden. Histologische Analysen zeigten, dass bei einer ICOS-Defizienz follikuläre T-Helferzellen nicht in die Keimzentrumsumgebung einwandern und daher keine T-Zellhilfe für die B-Zellen anbieten können. Dadurch kann die Keimzentrumsreaktion nicht weiter aufrechterhalten werden und eine Ausbildung von kleineren Keimzentren ist die Folge. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass eine fehlende ICOS-Interaktion zwischen T- und B-Zellen zu einer Störung der Plasmazellgenerierung führt, wodurch auch die Mengen an messbaren Serumimmunglobulinen beeinflusst werden. Eine erhöhte Gabe von ICOS-defizienten T-Zellen kann diese Effekte nicht vollständig ausgleichen. Daher ist erkennbar, dass ICOS eine Vielzahl von zusätzlichen Faktoren beeinflusst, die für die ICOS-abhängigen B-Zelleffekte verantwortlich sind.

Schlagwörter:

ICOS, T-B Kooperation, B-Zellentwicklung, B-Zelldifferenzierung

Abstract

The inducible costimulator ICOS, structural and functional similar to CD28, plays an important regulatory role in T cell receptor function. The ICOS deficiency in humans is described as a severe dysfunction of the humoral immune response, resulting in dramatic reduced B cell numbers and impaired antibody response against pathogens. The murine ICOS-deficiency also leads to a disturbed T cell dependent immune response resulting in a reduced germinal center formation. Various *in vitro* and *in vivo* studies attributes this phenomenon to impaired upregulation of cell surface communication molecules and cytokine synthesis by ICOS-deficient T cells. In this work the investigations with ICOS KO mice should clarify the impact of ICOS in B cell development. As observed, ICOS can only play a role in the late phase B cell development, because the interaction partner is expressed on transitional B cells in the spleen. The establishment of an *in vivo* adoptive T-B transfer system could determine for the first time the role of ICOS in T-B cooperation in early immune response stages on antigen specific T and B cell levels. As shown, ICOS deficiency influences in a dramatic extend the B cell expansion and B cell proliferation. For the first time *in vivo*, we could demonstrate that ICOS plays a significant role by influencing the regulation of various B cell surface markers, which affects the B cell activation, B cell proliferation and B differentiation in germinal center or plasma cell reaction. Histological investigations revealed in the ICOS-deficiency that follicular T helper cells could not migrate into the germinal center microenvironment and therefore could not provide T cell help for B cells. As a result, the germinal center reaction could not maintained and therefore the formation of little germinal centers occurred. The missing interaction between T and B cells leads to a dysfunction in plasma cell generation and also influences the detectable amounts of serum immunoglobulines. An administration of higher ICOS KO T cell numbers could not fully compensate these effects. Therefore, ICOS bias multitudes of additional factors, which are responsible for the ICOS dependent B cell effects.

Keywords:

ICOS, T-B cooperation, B cell development, B cell differentiation

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	IV
Abkürzungen.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Die B-Zellen	1
1.2 Die B-Zellentwicklung	1
1.3 Die Differenzierung reifer B-Zellen zu Effektor-B-Zellen	3
1.4 Die Rolle kostimulatorischer Moleküle bei der T-B Kooperation	5
1.5 Das kostimulatorische Molekül ICOS und sein Ligand	7
1.6 Mausmodelle zur in vivo Studien der T-B Kooperation	9
1.7 Zusammenfassung der Aufgabenstellung	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Chemikalien und Lösungen	12
2.2 Tierexperimentelle Methoden.....	12
2.2.1 Verwendete Mäusestämme	12
2.2.2 Aufbereitung der Donorzellen für den adoptiven T-B Transfer	13
2.2.3 Durchführung des adoptiven T-B Transfers	14
2.2.4 Immunisierung der Tiere	14
2.3 Zellbiologische Methoden	14
2.3.1 Aufreinigung von murinen Lymphozyten aus verschiedenen Geweben.....	14
2.3.2 Anreicherung und Reinigung der Lymphozyten durch MACS.....	16
2.4 Die Durchflusszytometrie (FACS)	17
2.4.1 Färbung der Zelloberflächenantigene.....	17
2.4.2 Färbung intrazellulärer Antigene.....	17
2.4.3 Verwendete Antikörper	18
2.4.4 Generierung und Auswertung der Durchflusszytometrie Daten	19
2.5 Untersuchungen zur Zellproliferation	20
2.5.1 Analyse der Proliferation mittels CFSE-Markierung.....	20
2.5.2 Analyse der Proliferation mittels BrdU-Markierung.....	21
2.6 Untersuchung apoptotischer Zellen.....	21
2.6.1 Analyse apoptotischer Zellen mittels Annexin-V Markierung.....	21
2.6.2 Analyse apoptotischer Zellen mittels Nachweis der Caspaseaktivität	22
2.7 Bestimmung der Serumimmunglobuline mittels ELISA	22

2.7.1	Herstellung der Mausseren für die ELISA-Tests	22
2.7.2	Durchführung der murinen ELISAs	22
2.8	Die Immunhistologie	23
2.8.1	Gewebeaufarbeitung für die Immunhistologie.....	24
2.8.2	Anfertigung der Gewebeschnitte für die Immunhistologie	24
2.8.3	Multiple Antigenmarkierung mit dem VECTASTAIN® System	24
2.9	Statistische Analyse	25
3	Ergebnisse	27
3.1	Einfluss von ICOS auf den B-Zellpool	27
3.1.1	Charakterisierung der Zellbestandteile im Mausblut	27
3.1.2	Charakterisierung der B-Zellsubpopulationen in der Milz.....	28
3.1.3	Die B-Zellentwicklung im Knochenmark	31
3.1.4	Die B-Zellentwicklung in der Milz	33
3.2	Die Etablierung eines adoptiven Transfermodells zur Untersuchung der frühen T-B Kooperation.....	38
3.2.1	Verwendete Mäusestämme	38
3.2.2	Durchführung des adoptiven T-B Transfers	39
3.2.3	Die Identifikation der transgenen Zellen im Rezipienten	40
3.2.4	T-Zellabhängigkeit des etablierten adoptiven T-B Transfermodells.....	43
3.2.5	Lokalisierung der transgenen Zellen in den Rezipienten	45
3.3	Die Rolle von ICOS im in vivo T-B Kooperationsmodell	47
3.3.1	Der Einfluss von ICOS auf die Expansion der transferierten Zellen	47
3.3.2	Die ICOS-Defizienz führt zur verringerten Proliferation transferierter B-Zellen im adoptiven T-B Kooperationsmodell.....	50
3.3.3	Der Einfluss von ICOS auf die Regulation verschiedener Aktivierungsmarker im adoptiven T-B Transfer	52
3.3.3.1	<i>Aktivierungsstatus transferierter T-Zellen im adoptiven T-B Transfermodell</i>	54
3.3.3.2	<i>Aktivierungsstatus transferierter B-Zellen im adoptiven T-B Transfermodell</i>	55
3.3.4	Kann eine höhere Gabe von transferierten T-Zellen den Effekt der ICOS-Defizienz ausgleichen?	60
3.4	Die Rolle von ICOS auf die Keimzentrumsentwicklung	64
3.4.1	Identifikation von Keimzentrums-B-Zellen	64
3.4.2	Die Keimzentrumsentwicklung in C57BL/6 WT und ICOS KO Mäusen	66
3.4.3	Die Keimzentrumsentwicklung im adoptiven T-B Kooperationsmodell	68

3.5 Die Rolle von ICOS auf die Plasmazellreaktion	71
3.5.1 Die Plasmazellreaktion in C57BL/6 WT und ICOS KO Mäusen	71
3.5.2 Die Plasmazellreaktion im adoptiven T-B Transfermodell	73
4 Diskussion	76
4.1 Etablierung eines adoptiven in vivo Transfersystems	76
4.2 Der Einfluss von ICOS auf die B-Zellen.....	80
4.2.1 Der Einfluss von ICOS bei frühen Phasen der T-B Kooperation.....	80
4.2.2 ICOS und die Differenzierung reifer B-Zellen zu Effektor-B-Zellen	82
4.2.3 ICOS und die B-Zellentwicklung.....	85
4.2.4 Mögliche Faktoren und Mechanismen für eine gestörte B-Zellentwicklung.....	88
4.3 ICOS-Defizienz Patienten im Vergleich zu ICOS KO Mäusen	90
5 Literaturverzeichnis.....	93
6 Anhang	100
6.1 Danksagungen	100
6.2 Veröffentlichungen	101
6.3 Erklärung	102

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1: Oberflächenmarker der einzelnen B-Zellentwicklungsstufen.....	3
Abb. 2: Schemazeichnung des adoptiven T-B Transfermodells.....	11
Abb. 3: Erste Schritte bei der durchflusszytometrischen Analyse	20
Abb. 4: Zellbestandteile und B-Zellsubpopulationen im Mausblut	28
Abb. 5: B-Zellpopulationen in der Mausemilz	29
Abb. 6: Zellpopulationen reifer B-Zellen in der Mausemilz	30
Abb. 7: FACS-Auswertung für die B-Zellentwicklungsstufen im Knochenmark	31
Abb. 8: Analyse der B-Zellentwicklungsstufen im Knochenmark	33
Abb. 9: FACS-Auswertung für die B-Zellentwicklungsstufen in der Milz	34
Abb. 10: Analyse der B-Zellentwicklungsstufen in der Milz.....	37
Abb. 11: Frequenz der transgenen Zellen der Donortiere	39
Abb. 12: Überblick der Analysegruppen des adoptiven T-B Transfers.....	40
Abb. 13: Identifikationsstrategie der transgenen T-Zellen im Rezipienten.....	41
Abb. 14: Detektion der transgenen B-Zellen im Rezipienten	41
Abb. 15: Identifikationsstrategie der transgenen B-Zellen im Rezipienten.....	42
Abb. 16: Verwendete Antigene zur Unterscheidung endogener und transgener Zellen.....	43
Abb. 17: T-Zellabhängigkeit des adoptiven T-B Kooperationsmodells	44
Abb. 18: Lokalisierung der transgenen Zellen in verschiedenen Rezipientenorganen	46
Abb. 19: Expansionskinetik transgener Zellen im adoptiven T-B Transfermodell	48
Abb. 20: Lokalisierung transgener T- und B-Zellen in der Histologie.....	49
Abb. 21: Der Einfluss von ICOS auf die B-Zellproliferation und Apoptose	51
Abb. 22: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf transgenen T-Zellen.....	54
Abb. 23: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf transgenen B-Zellen	59
Abb. 24: Die B-Zellexpansion in Abhängigkeit der T-Zellzahl	61
Abb. 25: Die B-Zellaktivierung und Proliferation in Abhängigkeit der T-Zellzahl	63
Abb. 26: Definition der Keimzentrums-B-Zellen in der Durchflusszytometrie und in der Histologie	65
Abb. 27: Der Einfluss von ICOS auf die Keimzentrumsreaktion	67
Abb. 28: Der Einfluss von ICOS auf die Keimzentrumsreaktion im adoptiven T-B Kooperationsmodell	69
Abb. 29: Die Keimzentrumsreaktion im adoptiven T-B Transfermodell in der Histologie	70
Abb. 30: Die Rolle von ICOS auf die Plasmazellreaktion.....	72
Abb. 31: Die Rolle von ICOS auf die Plasmazellreaktion im adoptiven T-B Transfermodell	74
Tab. 1: Übersicht der verwendeten Lösungen.....	12
Tab. 2: Übersicht der verwendeten Antikörpern in der Durchflusszytometrie	19
Tab. 3: Übersicht der verwendeten Antikörpern bei den ELISA Tests	23
Tab. 4: Übersicht der verschiedenen Farbkombinationen beim VECTASTAIN® Systems	25
Tab. 5: Analysierte Aktivierungsmarker der transferierten T-Zellen.....	52
Tab. 6: Analysierte Aktivierungsmarker der transferierten B-Zellen.....	53
Tab. 7: Übersicht der Transfergruppen.....	60

Abkürzungen

A647	Alexa Fluor 647
A700	Alexa Fluor 700
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
B. pert.	Bordetella pertussis
bio	biotinyliert
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serum Albumin
BZR	B-Zellrezeptor
CFSE	5, 6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
CGG	Chicken Gamma Globulin
CVID	Common Variable Immunodeficiency, allgemeines variables Immundefektsyndrom
Cy5	Cyanine 5
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FCS	Fötales Kälberserum
FDZ	follikuläre dendritische Zellen
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLICA	Fluorophor-gekoppelter Caspaseinhibitor
FO	follikuläre B-Zellen
GC	Germinal Center, engl. für Keimzentrum
h	Stunde
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICOS	Induzierbarer Kostimulator
ICOS-L	Induzierbarer Kostimulator Ligand
Ig	Immunglobulin
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
KO	Knockout
L	Ligand
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting, engl. für Magnetische Zellsortierung
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex, engl für Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MZ	Marginalzonen-B-Zellen
NP	Nitrophenol
NP-OVA	Nitrophenol gekoppelt an Ovalbumin
OVA	Ovalbumin
PALS	Periarteriolar Lymphoid Sheath, engl. für periarterielle lymphatische Scheide
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin

Abkürzungen

PE-Cy5.5	Phycoerythrin-Cy5.5
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7
PerCp	Peridinin Chlorophyll-a Protein
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
POD	Peroxidase
RT	Raumtemperatur
SLE	systemischer Lupus erythematodes
T1	1. transitioniellen Stadium
T2	2. transitioniellen Stadium
T3	3. transitioniellen Stadium
Tab.	Tabelle
TFH	Follikuläre B-Helfer T-Zellen
TMB	3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TZR	T-Zellrezeptor
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Die B-Zellen

B-Lymphozyten, oder auch B-Zellen genannt, gehören wie die T-Zellen zu den Leukozyten und sind als einzige Zelltypen in der Lage, Antikörper zu bilden. Zusammen mit den T-Zellen bilden sie den Hauptbestandteil des adaptiven Immunsystems aus. Während die zellvermittelte Immunantwort durch T-Zellen stattfindet, bilden B-Zellen durch die Produktion von Antikörpern die humorale Immunantwort aus. Bei einer Aktivierung durch Antigene können reife B-Zellen zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen differenzieren. Damit spielen B-Zellen eine wichtige Rolle bei der Krankheitsbekämpfung. Autoimmunerkrankungen, wie z. B. die rheumatoide Arthritis (Berek et al., 2005), oder die Produktion von Autoantikörpern (Hiepe et al., 2005) haben oft molekulare Ursachen, die dann zu einer Fehlfunktion der B-Zellen führen. Das Verständnis der Grundlagen bei der B-Zellentwicklung und B-Zelldifferenzierung dient auch dazu, neue molekulare Angriffspunkte dieser B-Zellfehlfunktionen aufzuklären. In dieser Arbeit soll mit Hilfe von *in vivo* Mausmodellen die B-Zellentwicklung und B-Zelldifferenzierung besser verstanden werden und die Rolle von ICOS bei diesen Prozessen aufgeklärt werden.

1.2 Die B-Zellentwicklung

Über komplexe Differenzierungsprozesse entwickeln sich aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen B-Lymphozyten im Knochenmark. Die Entdeckung diverser Oberflächen- und zytoplasmatischen Markern ermöglichte es, die einzelnen Stadien der B-Zellentwicklung zu untersuchen (Rolink et al., 2001). Zur allgemeinen Erkennung dieser frühen Vorläufer-B-Zellen nutzt man die Oberflächenexpression von B220, eine vom Molekulargewicht schwerere Form von CD45 (Hardy et al., 1991). Weiterhin führte Hardy et al. zu einer genaueren Identifizierung der einzelnen Subtypen eine neue Nomenklatur ein, die die Vorläufer-B-Zellen im Knochenmark in sechs bzw. sieben Fraktionen einteilt: Fraktion A, B, C, C', D, E und Fraktion F. Die Fraktionen A bis C' sind B-Zellsubpopulationen der sogenannten pro-B-Zellen. In diesem Zellstadium erleben die Vorläufer-B-Zellen die VDJ_H Arrangierung (Rearrangierung der schweren Kette) und exprimieren B220 und CD43 auf ihrer Zelloberfläche. Bei einer erfolgreichen Rearrangierung der schweren Kette wird CD43 herunterreguliert und die Vorläufer-B-Zellen wird als pre-B-Zelle bezeichnet bzw. wird in die Fraktion D eingeteilt. B-Zellen der Fraktion D rearrangieren die leichte Kette (VJ_L Arrangierung) und differenzieren zu unreifen B-Zellen der Fraktion E. In diesem Differenzierungsstadium sind B-Zellen unabhängig von Stromafaktoren und wandern nach der ersten negativen Selektion der B-Zellrezeptoren (BZR) mit endogenen Antigenen vom

Knochenmark über den Zentralsinus zur weiteren Reifung in die Milz. In diesem Schritt reifen sie in das transitionale Stadium 1 (Carsetti et al., 1995). Diese B-Zellen nennt man auch T1 B-Zellen (T1). Sie unterscheiden sich deutlich von den Vorläufer-B-Zellen, da sie jetzt IgM auf ihrer Oberfläche tragen. Die Untersuchungen von Osmond et al. zeigten, dass junge Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen etwa 2×10^7 dieser Vorläufer-B-Zellen pro Tag produzieren (Osmond et al., 1991; Osmond et al., 1993). Danach wandern sie von der PALS (Periarteriolar Lymphoid Sheath, engl. für periarterielle lymphatische Scheide) in den B-Zellfollikel, wo sie das zweite transitionale Stadium (T2) erreichen. Diese T2 CD21^{int} B-Zellen exprimieren zusätzlich zu IgM noch IgD und sind die Vorläuferzellen für die follikulären B-Zellen und Marginalzonen-B-Zellen (Meyer-Bahlburg et al., 2008). In diesem Stadium differenzieren sich die B-Zellen entweder weiter über das T3 Stadium zu follikulären B-Zellen oder über das T2 Marginalzonen Vorläufer-B-Zellenstadium (T2 MZ pre) zu Marginalzonen-B-Zellen. Die Fraktion F im Knochenmark besteht aus reifen, zirkulierenden B-Zellen, die den gleichen Phänotyp wie follikuläre B-Zellen aus der Milz oder Lymphknoten besitzen und möglicherweise den zirkulierenden B-Zellpool repräsentieren. In den einzelnen Stufen des Entwicklungsprozessen exprimieren die unreifen B-Zellen, wie die Vorläufer-B-Zellen im Knochenmark, spezifische Oberflächenmarker, die man zur Identifizierung in der Durchflusszytometrie nutzen kann. Die Abb. 1 fasst die einzelnen Nomenklaturen der Entwicklungsstufen der Vorläufer-B-Zellen im Knochenmark und Milz zusammen und gibt einen Überblick über deren spezifische Oberflächenmarkerexpression.

Eine erfolgreiche B-Zellentwicklung im Knochenmark beinhaltet eine Vielzahl von entscheidenden Kontrollpunkten wie z. B. die Generierung funktionierender Proteine der schweren Kette, der Zusammenbau des pre-B-Zellrezeptors, die Zusammenführung der schweren mit der leichten Kette und die Selektion zur Vermeidung einer Autoreaktivität. Die Untersuchungen diverser Transkriptionsfaktoren bei der B-Zellentwicklung mit Hilfe von Knockout Mäusen zeigten eine transkriptionelle Kontrolle bei der Hämatopoese. Auch Defekte bei der Immunglobulin (Ig) Rearrangierung oder B-Zellrezeptor (BZR) Bildung können Einfluss auf die B-Zellentwicklung haben. Ein weiterer wichtiger Faktor für die B-Zellreifung in der Milz ist der B-Zellaktivierungsfaktor BAFF (Mackay et al., 2002). BAFF gehört zu der Tumor Nekrose Faktor Familie (TNF) und ist auch unter dem Namen B-Lymphozyten Stimulator BLyS bekannt (Schneider et al., 1999). Er besitzt drei Rezeptorbindungspartner: das B-Zellreifungsprotein (B-cell maturation protein) BCMA, der transmembrane Aktivator, Calciummodulator und Cyclophilin Ligand Interaktor TACI und der BAFF Rezeptor (BAFF-R) (Thompson et al., 2000; Gross et al., 2001). Die exklusive Rolle von BAFF auf B-Zellen erfolgt durch die Bindung an BAFF-R, wodurch die

B-Zellexpansion und das B-Zellüberleben reguliert wird. Eine BAFF- bzw. BAFF-R-Defizienz zeigte bei Mäusen einen B-Zellentwicklungsstopp im T1 Stadium und ein Fehlen von T2 und reifen B-Zellen (Schiemann et al., 2001). Bei einer BAFF Überexpression ist eine B-Zellakkumulation im T2 Stadium zu beobachten (Mackay et al., 1999; Batten et al., 2000). Daher kann vermutet werden, dass BAFF die B-Zellentwicklung von T1 zu T2 und zu reifen B-Zellen durch Regulation der T2 B-Zellanzahl kontrolliert.

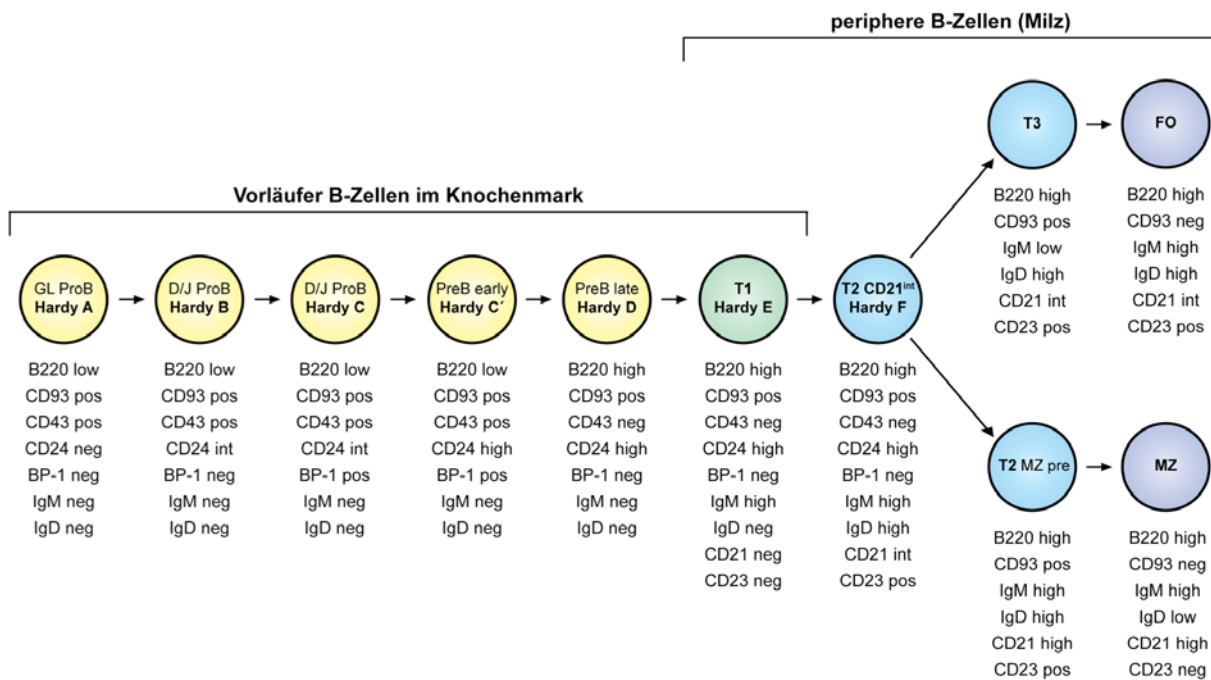


Abb. 1: Oberflächenmarker der einzelnen B-Zellentwicklungsstufen

Zusammenfassung der verwendeten Oberflächenmarker zur Identifikation der einzelnen B-Zellentwicklungsstufen (Amano et al., 1998; Loder et al., 1999; Allman et al., 2001; Hardy et al., 2001; Tung et al., 2004; Pillai et al., 2005; Meyer-Bahlburg et al., 2008).

1.3 Die Differenzierung reifer B-Zellen zu Effektor-B-Zellen

Naive follikuläre B-Zellen können nach einer T-Zell-abhängigen Stimulation drei verschiedene Wege der Differenzierung erfahren. Nach einer klonalen Expansion ist es möglich, dass aus aktivierten, follikulären B-Zellen kurzlebige extrafollikuläre Plasmazellen, langlebige Keimzentrumsplasmazellen oder Gedächtnis B-Zellen entstehen. Die Affinität des BZR ist neben anderen Faktoren entscheidend für die weitere Differenzierung zum entsprechenden Effektor-B-Zelltyp. Eine hohe BZR-Affinität zum Antigen fördert die Entwicklung zu kurzlebigen Plasmazellen während eine mittelstarke BZR-Affinität die Differenzierung zur langlebigen Plasmazelle fördert. B-Zellen mit einem niedrig affinen BZR zum Antigen werden zum Keimzentrum rekrutiert, wo sie dann entweder zu langlebigen Plasmazellen oder Gedächtnis B-Zellen differenzieren (Benson et al., 2007).

Ein Kontakt zwischen aktivierten, Antigen-spezifischen T-Zellen mit B-Zellen in der T-Zellzone führt innerhalb von 24 bis 48 Stunden zur Generierung von Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Diese Differenzierung der B-Zellen bezeichnet man als extrafollikuläre Plasmazellreaktion (MacLennan et al., 2003). Die Entstehung der extrafollikulären Plasmazellen ist verantwortlich für eine schnelle Antikörperproduktion und kann in vier Phasen eingeteilt werden: 1. Antigenbindung der B-Zelle, 2. T-B Interaktion in der T-Zellzone mit anschließender B-Zell-expansion, 3. Bildung extrafollikulärer Foci, in denen das Wachstum der Plasmablasten und die Differenzierung zu Plasmazellen stattfindet, und 4. die Differenzierung zu langlebigen Plasmazellen (MacLennan et al., 2003).

Die B-Zellfollikel in den Lymphorganen können entweder als ruhende, primäre Follikel oder als aktivierte, sekundäre Follikel vorkommen. Die primäre Follikel bestehen zum größten Teil aus naive B-Zellen, die ausgiebig umherwandern um Antigene zu erkennen. Die sekundären Follikel bestehen aus einem Keimzentrum (engl. germinal center; GC), das die Aufgabe hat, B-Zellen zu rekrutieren um die humorale Immunantwort zu steigern und aufrechtzuerhalten (Allen et al., 2008). Die Keimzentrumsreaktion wird charakterisiert durch eine klonale Expansion, Rekombination des IgH Locus (Ig-Klassenwechsel), somatische Hypermutation der V_H Gene und Selektion für eine erhöhte BZR-Affinität. Die einzelnen Bereiche eines reifen Keimzentrums kann man histologisch durch die Anwesenheit eines dichten Netzwerks aus follikulären dendritischen Zellen (FDC) bestimmen (Liu et al., 1992; Camacho et al., 1998). Dieses FDC-Netzwerk befindet sich distal von der T-Zellzone, der sogenannten hellen Zone, die in der Hellfeld Histologie heller erscheint (Liu et al., 1992; MacLennan, 1994). Das Kompartiment der dunklen Zone liegt näher an der T-Zellzone und besteht hauptsächlich aus B-Zellblasten (Liu et al., 1991; Hardie et al., 1993). Ein klassisches Modell der GC Funktion, auch bekannt unter dem Namen „Cyclic-Re-entry“ ist, besagt, dass B-Zellen in der dunklen Zone mehrere schnelle Proliferationsrunden und die somatische Hypermutation der Antikörpergene durchleben. Anschließend wandern die B-Zellen in die helle Zone, wo die Selektion der Oberflächenantikörper auf das Antigen stattfindet (MacLennan et al., 1994; Kelsoe et al., 1996; Manser et al., 2004; McHeyzer-Williams et al., 2006; Tarlinton et al., 2006). Da das FDC-Netzwerk und seine Antigenpräsentation sich in der hellen Zone befindet, wurde vermutet, dass die Antigenerkennung nur in der hellen Zone stattfindet. Eine negative Selektion durch die FDC führt zu einem apoptotischen Absterben der B-Zellen. Die Präsenz apoptotischer B-Zellen in der hellen Zone ist konsistent mit dieser Vermutung, obwohl auch in der dunklen Zone apoptotische B-Zellen detektiert wurden (Hardie et al., 1993). Neueste experimentelle Untersuchungen und Computersimulationen erwecken aber den Anschein, dass dieses klassische Modell nicht mehr zutreffend ist (Haberman et al., 2003; Manser et al., 2004;

Wang et al., 2005; Meyer-Hermann et al., 2006; Hauser et al., 2007). Nach der Affinitätsreifung der B-Zellen entscheiden diverse Transkriptionsfaktoren über die weitere Differenzierung zur langlebigen Plasmazelle oder Gedächtnis B-Zelle (Calame et al., 2003). *In vitro* Analysen zeigten, dass auch verschiedene Zytokine zur B-Zelldifferenzierung im Keimzentrum beitragen. Die Entwicklung zur Plasmazelle wird über eine Sekretion von IL-10 begünstigt und eine IL-4 Sekretion fördert die Differenzierung zur Gedächtnis B-Zelle (Calame et al., 2003).

1.4 Die Rolle kostimulatorischer Moleküle bei der T-B Kooperation

Bei der Regulation einer T-Zell-abhängigen, humoralen Immunantwort spielen kostimulatorische Moleküle eine entscheidende Rolle. Sie beeinflussen bei der initialen Aktivierung die T-Zellen und entfalten ihre Wirkung bei der Keimzentrums- und extrafollikuläre Plasmazellreaktion. Das wichtigste kostimulatorische Molekül für naive T-Zellen ist CD28 und wird konstitutiv exprimiert (Gross et al., 1992). Bei der initialen Aktivierung einer Primärantwort zwischen den Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) und Antigen-spezifischer T-Zellen ist ein kostimulatorisches Signal über CD28 für die vollständige Aktivierung der T-Zellen nötig (Schwartz et al., 1992; Chambers et al., 1997; Gause et al., 1997; Sharp et Freeman, 2002). Die Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 sind als Liganden für CD28 bekannt und werden von APZ exprimiert (Lenschow et al., 1996). Erst im Anschluss an die Aktivierung exprimieren die T-Zellen weitere kostimulatorische Rezeptoren, wie z. B. ICOS oder OX40, in einer höheren Anzahl. Nach der T-Zellaktivierung erfolgt eine Produktion von diverser Zytokine, die in autokriner Weise die T-Zellen weiter aktivieren und auch auf B-Zellen wirken. Ein wichtiges Zytokin der frühen Aktivierungsphase ist Interleukin 2 (IL-2), das eine große Rolle bei der klonalen Expansion der Antigenspezifischen T- und B-Zellen in der Initiierungsphase der Immunantwort spielt (Jung et al., 1984; Nakanishi et al., 1984; Schwartz et al., 1992). Eine anhaltenden Interaktion zwischen T-Zellen und APZ reguliert die weitere Differenzierung der aktivierten T-Zellen, d. h. sie beeinflussen die Richtung der T_H1 oder T_H2 T-Zelldifferenzierung und damit das anschließende Zytokinprofil (Croft, 2003; McHeyzer-Williams et al., 2004; Sharp et Freeman, 2002).

Zur vollständigen Aktivierung der B-Zellen ist analog zu den T-Zellen ein kostimulatorisches Signal notwendig. Aktivierte T-Zellen bieten diese kostimulatorische Hilfe über den Liganden von CD40 an (CD40L, CD154; de Boer et al., 1993; Banchereau et al., 1994; Grewal et al., 1998). Die Interaktion zwischen CD40L und auf B-Zellen konstitutiv exprimierten CD40 ist das wesentliche Signal für die B-Zellaktivierung, wodurch B-Zellen aus der T-Zell-reichen Zone auswandern und eine starke Expansion unterlaufen. Einige der Antigen-spezifischen B-Zellen können innerhalb

dieser Expansion ein Keimzentrum formen. Zur Untersuchungen der kostimulatorischen Einflüsse bei der späten B-Zelldifferenzierung im Keimzentrum war die Identifizierung von exprimierten Oberflächenmolekülen der verschiedenen B-Zellsubpopulationen überaus hilfreich. Shinall et al. definierten verschiedene Marker, die es möglich machten, die Differenzierungsstadien der Keimzentrums-B-Zellen zu unterscheiden (Shinall et al., 2000). In den späten Phasen der B-Zelldifferenzierung im Keimzentrum ist die CD40/CD40L Interaktion daran beteiligt, dass B-Zellen einen Ig-Klassenwechsel durchführen können. Diverse Zytokine, die von den aktivierten T-Zellen produziert werden, unterstützen den Ig-Klassenwechsel (Caux et al., 1994).

Welche kostimulatorischen Moleküle bei der extrafollikulären Plasmazellreaktion involviert sind, ist bisher nur schlecht untersucht (MacLennan et al., 2003). Jedoch ist bekannt, dass Signale über OX40/OX40L die Differenzierung zu Plasmazellen begünstigen (Calame et al., 2003). McHeyzer-Williams et al. zeigten 2004 mit Hilfe eines adoptiven Transfersystem *in vivo*, dass die Differenzierung zur Plasmazelle durch Ly6C⁺ T-Zellen begünstigt wird. Genauere Analysen über die verantwortlichen kostimulatorischen Moleküle auf Seiten der T-Zellen wurden in dieser Arbeit nicht gezeigt (McHeyzer-Williams et al., 2004). Ob beim Ig-Klassenwechsel eine Interaktion zu T-Zellen benötigt wird, ist ebenfalls nicht bekannt. Ähnliche Differenzierungsabläufe im Keimzentrum lassen aber eine T-B Zellinteraktion vermuten.

Enddifferenzierte B-Zellen, also langlebige Gedächtnis-B-Zellen oder Plasmazellen wandern relativ schnell aus dem Lymphknoten ins Blut oder Knochenmark (McHeyzer-Williams et al., 2001; Cyster, 2003;). Da in der Maus bisher kein geeigneter Marker zur Identifizierung von Gedächtnis-B-Zellen in der Durchflusszytometrie vorhanden ist, stellt die Untersuchung zur Rolle kostimulatorischer Moleküle bei der Gedächtnis-B-Zelldifferenzierung eine große Herausforderung dar. Es scheint jedoch, dass eine Differenzierung zur Gedächtnis-B-Zelle über ein CD40 Signal erfolgt, wobei publizierte Studien zur CD40/CD40L Interaktion widersprüchliche Ergebnisse zeigen. Zudem lässt das langfristige Überleben der GedächtnisB-Zellen und Plasmazellen vermuten, dass eine T-B Interaktion im Lymphknoten neben anderen Faktoren dazu beiträgt.

Zur Terminierung der Immunantwort und Vermeidung einer Überaktivierung der T- und B-Zellen sind eine Reihe von negativ regulatorischen Molekülen bekannt (Saito et al., 1998). Das mit CD28 strukturell verwandtes Oberflächenmolekül CTLA-4 bindet ebenfalls an CD80/CD86 (Brunet et al., 1987; Thompson et al., 1997) und durch die Interaktion wird die CD28 induzierte IL-2 Synthese supprimiert (Walunas et al., 1994; Krummel et al., 1996; Walunas et al., 1996). In den späten Phasen der Immunantwort ist zu beobachten, dass aktivierte T-Zellen den Liganden von CD95 exprimieren. Dieses Molekül erhöht die Sensitivität für die Apoptose (Krammer et al., 1994).

1.5 Das kostimulatorische Molekül ICOS und sein Ligand

Als vor einigen Jahren der induzierte kostimulatorische Rezeptor ICOS (inducible costimulator) als ein zu CD28 strukturell und funktionell verwandtes Molekül kloniert wurde, mussten die Abläufe bei der T-Zellaktivierung neu überdacht werden (Hutloff et al., 1999). Denn bisher galt CD28 als der wesentliche kostimulatorische Rezeptor, der für die Aktivierung der T-Zelle zuständig ist (Sharpe et Freeman, 2002; Croft, 2003). Die Proteinstruktur von ICOS ist mit der von CD28 und CTLA-4 sehr nach verwandt. So handelt es sich bei ICOS um ein glykosyliertes Disulfid verbundenes Homodimer, dessen zytoplasmatischer Rest ein YMFM Strukturmotiv besitzt. Dieses Motiv dient als Bindungsstelle für die p85 Untereinheit der Phosphatidyl-inositol-3-Kinase (PI3K), wobei die PI3K Aktivität bei der ICOS-Stimulation stärker ist als bei CD28 Kostimulation (Coyle et al. 2000, Parry et al. 2003).

Die Charakterisierung ICOS-positiver Zellen *in vivo* wurde in der Publikation Löhning et al. von 2003 intensiv bearbeitet. So exprimieren in einem peripheren Lymphknoten einer nicht immunisierten Maus ca. 2-3% aller CD4⁺ T-Zellen ICOS konstitutiv. Die Analyse dieser T-Zellen zeigt, dass es sich um kürzlich aktivierte Effektor- bzw. Memory-T-Zellen handelt. Zudem tragen auch CD8⁺ T-Zellen ICOS auf ihrer Oberfläche (Yoshinaga et al. 1999; Coyle et al. 2000). Die Expression von ICOS wird durch die T-Zellrezeptor (TZR) und CD28 Expression beeinflusst. (Beier et al. 2000; Coyle et al. 2000). So wurde gezeigt, dass eine CD28 Kostimulation die ICOS-Expression verstärkt (McAdam et al. 2000). Daher kann vermutet werden, dass nicht alle CD28 abhängigen Effekte allein durch eine CD28 Kostimulation verursacht werden. Weiterhin korreliert das Niveau der ICOS-Expression mit der Produktion von Zytokinen, wie IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, die Einfluss auf die B-Zelldifferenzierung haben. Der einzige Ligand von ICOS ist unter den Namen ICOS-L, B7h, GL50, B7RP-1, LICOS und B7-H2 bekannt (Brodie et al., 2000; Ling et al., 2000; Mages et al., 2000; Swallow et al., 1999; Wang et al., 2000; Yoshinaga et al., 1999) und befindet sich auf dendritischen Zellen, B-Zellen und auf einer Reihe von nicht lymphoiden Zellen und wird konstitutiv exprimiert. Eine Regulation dieser konstitutiven Expression ist mit einem inflammatorischen Stimulus möglich (Sharpe et Freeman, 2002).

Neben der Proteinstruktur ist auch die Funktion von ICOS mit der von CD28 vergleichbar (Hutloff et al., 1999; Yoshinaga et al., 1999). *In vitro* Studien zeigten den regulatorischen Einfluss von ICOS auf die Differenzierung, Proliferation, Zytokinsynthese und das Überleben der T-Zellen. (Hutloff et al. 1999; Yoshinaga et al. 1999; Coyle et al. 2000; McAdam et al. 2000). Weiterhin reguliert ICOS das Überleben und die Expansion von Effektor- und regulatorischen T-Zellen (Burmeister et al., 2008). McAdam zeigte mit Hilfe seiner *in vivo* ICOS-Blockadestudien, dass während der initialen T-Zellstimulation die T_H1Differenzierung verstärkt und die T_H2-Differenzierung gehemmt wird

(McAdam et al. 2000). In anderen Publikationen wurde jedoch gezeigt, dass ICOS sowohl T_H1- und T_H2-abhängige Zytokine induzieren kann und somit nicht nur einen Einfluss auf die T_H2-Antwort hat. (Hutloff et al., 1999; Mages et al., 2000; McAdam et al., 2000; Dong et al., 2001a; Villegas et al., 2002; Bonhagen et al., 2003; Löhning et al., 2003). Mit Hilfe eines OVA-induzierten T_H2-Lungeninflammationsmodells konnte gezeigt werden, dass ICOS-exprimierende T-Zellen verantwortlich sind für eine Inflammation und Akkumulation der B-Zellen im Lungengewebe. Weitere Studien zeigten aber auch, dass eine ICOS-Blockade zu einer Beeinträchtigung der T_H1- und T_H2-Antwort während einer Infektion führt (Kopf et al., 2000; Greenwald et al., 2002). Eine T_H1-vermittelte Abstoßung eines Transplantates kann durch Blockade von ICOS vermindert werden (Özkaynak et al., 2001).

Verschiedenste *in vitro* bzw. *ex vivo* Analysemethoden, vor allem aber die Untersuchungen der ICOS bzw. ICOS-L defizienten Mäusen zeigten den deutlichen Einfluss von ICOS auf die B-Zelldifferenzierung und die T-Zell-abhängige B-Zellantwort (Dong et al., 2001a; McAdam et al., 2001; Tafuri et al., 2001; Mak et al., 2003; Wong et al., 2003). Eine ICOS-Defizienz in der Maus hat keinerlei Einfluss auf die T- bzw. B-Zellzahlen. Jedoch besitzen diese Mäuse nach Immunisierung kleinere Keimzentren und produzieren verringerte Mengen an Immunglobulinen. Weiterhin sind der Ig-Klassenwechsel und die Gedächtnis-BZellentwicklung durch eine ICOS-Defizienz gestört. Bei transgenen Mäusen, die eine lösliche Form von ICOS-L exprimieren, wurden stark erhöhte Plasmazellzahlen und erhöhte Ig-Spiegel beobachtet (Yoshinaga et al., 1999). Die verminderte Keimzentrumsformation und die gestörte Fähigkeit zum Ig-Klassenwechsel bei ICOS-defizienten Mäusen kann durch eine CD40 Kostimulation behoben werden (McAdam et al., 2001). Ein wichtiger Regulator der B-Zelldifferenzierung ist das Zytokin IL-4. Daher könnte die verminderte IL-4 Produktion der T-Zellen ICOS-defizienter Mäuse auch eine Erklärung für die gestörte B-Zelldifferenzierung sein (Dong et al., 2001a; Tafuri et al., 2001). Jedoch unterscheidet sich der Phänotyp von IL-4 defizienten Mäusen deutlich von dem der ICOS-KO Mäuse, so dass ein Fehlen von IL-4 keine Erklärungsmöglichkeit für den ICOS KO Phänotyp sein könnte. Weiterhin besteht ein enger Zusammenhang zwischen der ICOS-Expression und dem Chemokin Rezeptor CXCR5 (Bonhagen et al., 2003). Dieser Chemokin Rezeptor wird von den sogenannten follikulären T-Helferzellen (TFH) exprimiert, eine kleine T-Zellsubpopulation, und beeinflusst deren Wanderung in den B-Zellfollikel (Schaerli et al., 2000).

Weitere wesentliche Funktionen von ICOS konnte durch die Identifikation von ICOS-defizienten Patienten aufgeklärt werden. Eine fehlende Expression von ICOS beim Menschen resultiert im klinischen Bild einer Common Variable Immunodeficiency (CVID) und führt zu einer verringerten Anzahl an naiven B-Zellen und einer fehlenden Gedächtnis-B-Zellpopulation im Blut der Patienten

(Grimbacher et al., 2003; Salzer et al., 2004). Diese Ergebnisse weisen auf eine wichtige Rolle der ICOS/ICOS-L Interaktion bei der B-Zelldifferenzierung hin. Die T-Zelldifferenzierung und die Zytokinproduktion scheint nicht durch eine ICOS-Defizienz betroffen zu sein. Außerdem führt eine ICOS-Defizienz erst im Jugend- bzw. Erwachsenenalter zu einer Erkrankung. Dies könnte auch eine Erklärung sein, weshalb der Phänotyp beim Menschen in einigen wesentlichen Aspekten sich so sehr von dem der Maus unterscheidet. Denn ICOS KO Mäuse wurden schon im Alter von etwa sechs Wochen untersucht, das umgerechnet einem Alter von fünf Menschenjahren entspricht. Daher könnte die Untersuchung von älteren Mäusen, die einen wiederholten Antigenkontakt erfahren haben, interessant sein, ob in dieser Situation die B-Zellzahlen ebenfalls abnehmen.

Bei der Isolierung von T- und B-Zellen aus peripherem Blut von SLE-Patienten (SLE; systemischer Lupus erythematoses) konnte gezeigt werden, dass sich die ICOS-L Expression der verschiedenen B-Zellpopulationen unterscheidet. Weiterhin gab es Hinweise, dass die ICOS/ICOS-L-Interaktion bei der Differenzierung zu Plasmazellen beteiligt ist. Immunhistologische Studien zeigten in der Niere eine ICOS-Beteiligung an der lokalen Immunglobulin Produktion der infiltrierenden B-Zellen (Hutloff et al., 2004). Die zentralen Fragen über die Rolle der ICOS/ICOS-L-Interaktion in der T-B Zellkooperation sind jedoch weitestgehend unbekannt und die molekularen Mechanismen noch nicht aufgeklärt.

1.6 Mausmodelle zur *in vivo* Studien der T-B Kooperation

Die Untersuchung einer frühen, spezifischen B-Zellantwort *in vivo* ist insofern problematisch, da man nur sehr geringe, Antigen-spezifische Zellausgangsfrequenzen (weniger als eine Zelle in 5000) analysieren kann, die natürlich im Tier vorkommen und aktiviert werden. Daher ist eine genauere Analyse dieser spezifischen Zellen auf Aktivierungsmarker, Expansion, Proliferation und Apoptoserate statistisch gesehen unzureichend. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu lösen, ist eine künstliche Erhöhung durch Transfer von monogenetischen Zellen im Tier, die dann untersucht werden können. Dieses Vorgehen bezeichnet man auch als adoptiven Transfer. Nach einer Immunisierung mit Schafserthrozyten oder komplexen Proteinen wie z. B. oder chicken gamma globulin (CGG), keyhole limpet hemocyanin (KLH) oder an ein Trägerprotein gekoppeltes Nitrophenol (NP) (z. B. Jacob et al., 1991) ist es dann möglich, die Antigen-spezifische Zellen *in vivo* zu identifizieren. Die Etablierung einer Hapten spezifischen Immunreaktion (z. B. Nitrophenol, Jacob et al., 1991) war insoweit ein wichtiger Fortschritt, da man spezifisch an das Hapten gebundene Zellen in der Histologie detektieren konnte.

Zur Untersuchung der frühen Phasen der T-B Kooperation auf Antigen-spezifischer Einzelzellebene ist es nötig, ein adoptives *in vivo* T-B Transfermodell zu entwickeln, das so wenig wie möglich künstlich auf die natürliche Immunantwort des Rezipienten einwirkt. Zudem könnte die Untersuchung der Rolle von ICOS *in vivo* bei der T-B Zellinteraktion einer Immunantwort interessante Aspekte bieten, da diese bisher noch nicht analysiert wurden. Eine erfolgreiche Etablierung solch eines Transfersystems muss einige Anforderungen erfüllen, die auch die Auswahl der verwendeten Donor- und Rezipiententiere beeinflusst. Zum einen sollte die Detektion der transferierten Zellen mit Hilfe klonotypischer Antikörper möglich sein. Zur Untersuchung einer T-Zell-abhängigen B-Zellantwort ist die Verwendung eines Antigens nötig, das gleichzeitig spezifisch an die transferierten T- und B-Zellen bindet. Weiterhin ist es hilfreich, wenn das verwendete Antigen bisher schon ausreichend charakterisiert wurde. Da auch ein Antigen-spezifischer Ig-Klassenwechsel untersucht werden soll, müssen die Donor B-Zellen aus BZR Knockin Mäusen stammen, da nur diese einen Ig-Klassenwechsel durchführen können.

Für den Transfer der transgenen T-Zellen hat man sich für folgende Mäusestämme entschieden: OT-II Tiere (Barnden et al., 1998) tragen einen transgenen TZR gegen das Peptid OVA323-339. B6.PL Mäuse exprimieren auf ihrer T-Zelloberfläche das Antigen Thy-1.1, das in der Durchflusszytometrie mittels monoklonaler Antikörper detektiert werden kann. Aus der Kreuzung von OT-II Mäusen mit B6.PL Mäusen erlangte man die B6.PL/OT-II Donortiere (OT-2 Mäuse), deren T-Zellen OVA-spezifisch sind und leicht in der Durchflusszytometrie detektierbar sind. Da die Rolle von ICOS bei der T-B Kooperation untersucht werden soll, wurden zusätzliche Kreuzungen der OT-2 und ICOS KO Mäusen (Özkaynak et al. 2001) unternommen. Dadurch generierte man Mäuse, deren transgene T-Zellen ICOS exprimieren bzw. Mäuse, deren transgene T-Zellen kein ICOS auf der Oberfläche tragen und somit keine Kostimulation über die Interaktion von ICOS und ICOS-L erfahren können.

Als Donoren für die transgenen B-Zellen wurden die im Labor von Klaus Rajewsky entwickelten B1-8i Mäuse (Sonoda et al., 1997) verwendet. Der B1-8i BZR dieser Mäuse entspricht der Keimbahnsequenz des prototypischen BZR gegen Nitrophenol (NP) bei C57BL/6 Tieren (Reth et al., 1978). Weiterhin sprechen eine Vielzahl von Argumenten für die Nutzung dieser Mäuse als B-Zelldonoren: Die Detektion der transgenen B-Zellen im adoptiven Transfer kann mit einem monoklonalen Antikörper gegen den transgenen BZR erfolgen (mAk Ac146; Reth et al., 1979). Zur Untersuchung einer T-Zell-abhängigen Immunantwort bietet sich der Kotransfer von OVA-Peptid spezifischen T-Zellen und B-Zellen dieser Maus besonders an. Eine Immunisierung mit NP gekoppelt an OVA (NP-OVA) führt zu einer T-Zell-abhängigen humoralen Immunantwort der B-Zellen. Der größte Vorteil dieser transgenen Mäuse ist jedoch, dass es sich nicht um

konventionelle transgene, sondern BZR Knockin Mäuse handelt, d. h. die B-Zellen sind in der Lage auch einen Ig-Klassenwechsel durchzuführen. Um die Frequenz der transgenen B-Zellen dieser Mäuse zusätzlich zu erhöhen, wurden sie mit CkT Tieren verpaart (Zou et al., 1993). Die neu generierten B1-8i Mäuse tragen nun eine Mutation im κ -Locus und bilden nur B-Zellrezeptoren, die mit κ leichten Ketten kombiniert sind. Die Schemazeichnung in Abb. 2 gibt einen Überblick der verwendeten Mäusestämme des *in vivo* T-B Transfermodells und zeigt die spezifische Bindung des verwendeten Antigens an die entsprechenden T- bzw. B-Zellrezeptoren.

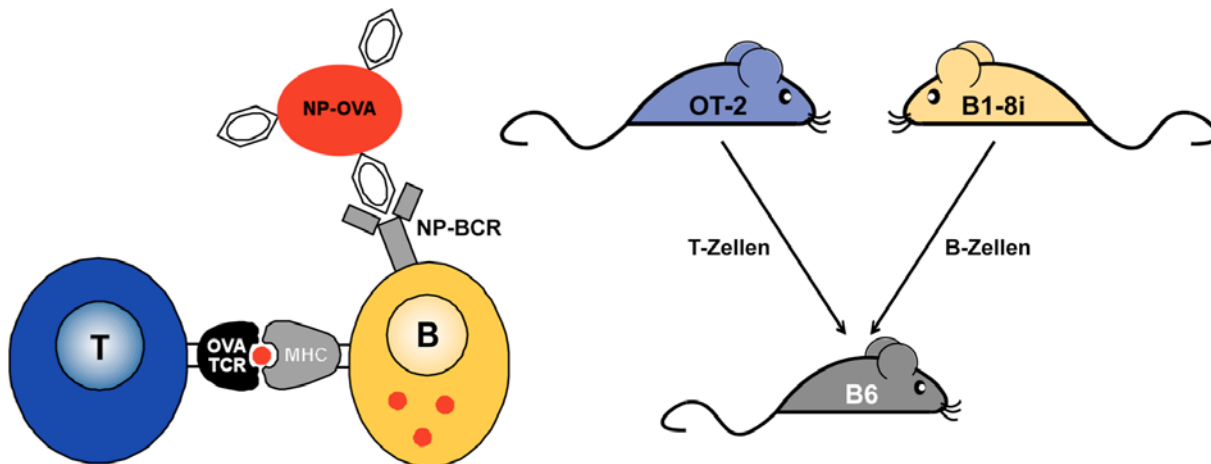


Abb. 2: Schemazeichnung des adoptiven T-B Transfermodells

Dafür werden OVA-spezifische T-Zellen und NP-spezifische B-Zellen zusammen in C57BL/6 oder ICOS KO Mäuse transferiert. Die anschließende Immunisierung mit NP gekoppelt an das Trägerprotein Ovalbumin (NP-OVA) führt zur Aktivierung der NP-spezifischen B-Zellen in Abhängigkeit von den OVA-Peptid spezifischen T-Helferzellen.

1.7 Zusammenfassung der Aufgabenstellung

Folgende Punkte sollten im Rahmen dieser Dissertation bearbeitet werden:

1. Mögliche Folgen einer ICOS-Defizienz bei der murinen B-Zellentwicklung
2. Aufbau eines adoptiven *in vivo* Transfersystems mit NP-spezifischen B-Zellen (B1-8i) und OVA-spezifischen T-Zellen (OT-2)
3. Die Rolle der ICOS/ICOS-L-Interaktion
 - in der frühen Phasen der T-B Kooperation auf Antigen-spezifischer Einzelzellebene
 - bei der Keimzentrums- und Plasmazellreaktion mit Hilfe des T-B Transfersystems

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungen

Lösung	Herstellung
ACK-Lösung	0,15 mM NH_4Cl + 10 mM KHCO_3 + 0,1 mM Na_2EDTA
Blockierlösung (ELISA)	PBS mit den Zusätzen: 10% fötales Kälberserum (FCS, Biochrom), 0,05% Tween 20
Blockierlösung (Histologie)	NEN-Lösung + 2xFc-Block
DAPI-Stammlösung	100 μM , Endkonzentration für FACS-Analyse: 0,33 μM
FACS-PBS	PBS + 2,5% fötales Kälberserum + 0,1% NaN_3
10xFc-Block	1 mg/ml anti-CD16/CD32 (Klon 2.4G2), 0,5 mg/ml Ratten IgG (Nordic, Tilburg)
MACS-PBS	PBS + 2 mM EDTA + 0,5% BSA (Fraktion V, Endotoxingehalt <1 EU/mg, PAA Laboratories GmbH, Cölbe)
PBS	136,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH_2PO_4 , 8,05 mM, Na_2HPO_4 , pH 7,3
Peroxidase-Block	1 mM NaN_3 , 10 mM Glukose, 1 U/ml Glukoseoxidase (Sigma-Aldrich) in PBS
TMB-Substratpuffer	TMB, 0,1 M Na_2HPO_4 (pH 5,0), H_2O_2 (Sigma-Aldrich)
ViaCount Lösung	2,5 g/ml LDS-751, 1 g/ml Propidiumiodid, 5 mM EDTA, 0,05% NaN_3 , pH 7,2
Waschpuffer (ELISA)	PBS + 0,05% Tween 20
Zellkulturmedium	RPMI 1640 (Biochrom KG, Berlin) mit den Zusätzen: 10% fötales Kälberserum + 50 μM -Mercaptoethanol

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Lösungen

Nicht erläuterte Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck AG (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) in der Qualität p.A. bezogen. Das sterile Plastikeinwegmaterial wurde von den Firmen Greiner GmbH (Frickenhausen), Nunc (Roskilde, Dänemark) oder Sarstedt (Nümbrecht) eingekauft.

2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1 Verwendete Mäusestämme

Für das *in vivo* adoptive T-B Transfermodell wurden OT-II Mäuse (Barnden et al. 1998) mit B6.PL Mäusen gekreuzt und dadurch die OT-2 Donortiere für die transgenen T-Zellen gewonnen. Da die Rolle von ICOS bei der T-B Kooperation untersucht werden soll, wurden zusätzliche Kreuzungen von OT-2 und ICOS KO Mäusen (Özkaynak et al. 2001) unternommen. B1-8i Mäuse (Sonoda et

al., 1997) wurden mit CkT Tieren (Zou et al., 1993) und Ly-5.1 Mäusen (Jackson) gekreuzt. Die gewonnenen B1-8i Mäuse wurden als Donortiere für die transgenen B-Zellen verwendet. Zusätzlich wurden noch folgende Tiere zur Durchführung der Experimente verwendet: ICOS KO Mäuse (Özkaynak et al. 2001), ICOS-L KO Mäuse (Wong et al. 2003) und C57BL/6 Tiere (Charles River) als Kontrolltiere. Generell wurden nur Tiere eingesetzt, die mindestens zehn Generationen auf einen C57BL/6NCrI Hintergrund zurück gekreuzt wurden und ein Mindestalter von acht Wochen erreicht hatten. Weiterhin wurde gewährleistet, dass die verwendeten Mäuse eines Experimentes gleichen Alters waren. Alle Tiere stammen aus einer SPF-Zucht und wurden nach Lieferung in einem konventionellen Tierstall des Robert Koch-Instituts gehalten. Die Durchführung der Experimente wurde vorab durch die lokale Ethikkommission genehmigt und erfolgte nach staatlichen Richtlinien.

2.2.2 Aufbereitung der Donorzellen für den adoptiven T-B Transfer

Um die Interaktion der T- und B-Zellen in einer Immunantwort zu untersuchen, muss gewährleistet sein, dass man, soweit es möglich ist, nur naive T-Zellen in den Rezipienten gibt. Aus diesem Grund wurden aus den Milzen der OT-2 WT oder OT-2 ICOS KO Mäuse eine Zellsuspension gewonnen (siehe 2.3.1.) und diese mit Hilfe einer MACS-Sortierung (siehe 2.3.2.) aufbereitet. Es handelte sich um eine CD62L^{high} Sortierung, d. h. naive T-Zellen, die CD62L stark exprimieren, wurden von den anderen Zelltypen getrennt. Bei einer erfolgreichen Sortierung gewinnt man eine Zellsuspension, die zu 95 % naive T-Zellen enthält.

Bei der Aufbereitung der transgenen B-Zellen wurden ebenfalls aus Milzen der B1-8i Tiere eine Zellsuspension gewonnen. Zur weiteren Analyse der transferierten B-Zellen in der Histologie dient ein Antigen zur Identifikation der transgenen B-Zellen, dass aber auch von T-Zellen exprimiert wird. Somit ist eine CD43- Sortierung nötig, um die T-Zellen abzutrennen. Bei Analysen mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde auf eine CD43- Sortierung verzichtet, da die Möglichkeit gegeben ist, mit mehreren Antikörpern verschiedene Oberflächenmarker zu detektieren und zu unterscheiden. Vor dem adoptiven Transfer wurde die Zellsuspension in der Durchflusszytometrie untersucht und auf ihre Reinheit untersucht. Eine Splenozytensuspension von B1-8i Mäuse enthält ca. 15-18% follikuläre, transgene B-Zellen. Durch eine CD43- Sortierung konnte diese Zellpopulation auf 35% angereichert werden.

2.2.3 Durchführung des adoptiven T-B Transfers

Beim adoptiven T-B Transfer wurden zusammen 2×10^6 CD62L^{high} sortierte, also naive OVA-Peptid spezifische T-Zellen mit $2,5 \times 10^6$ follikulären, NP-spezifischen B-Zellen intravenös (i.v.) in die Rezipientenmäuse transferiert. Da der Einfluss von ICOS auf die frühe T-B Kooperation untersucht werden sollte, wurden drei Analysegruppen eingeführt. In der ersten Gruppe exprimieren nur die transferierten T-Zellen ICOS, die endogenen T-Zellen der ICOS KO Rezipienten tragen kein ICOS auf der Zelloberfläche (WT Gruppe). Beim Transfer von transgenen ICOS KO T-Zellen in ICOS KO Rezipienten (ICOS KO Gruppe) dient das generelle Fehlen von ICOS zur Untersuchung möglicher Effekte. Eine weitere Gruppe mit normaler ICOS Expression auf transferierten T-Zellen und endogenen T-Zellen, diente zur Kontrolle des Systems (WT in WT Gruppe).

2.2.4 Immunisierung der Tiere

Es wurden zwei verschiedene Routen der Antigengabe durchgeführt: Die intraperitoneale (i.p.) Immunisierung und die lokale Immunisierung. Bei der ersten Immunisierungsrouten wurde den Mäusen 50 µg Alum präzipitiertes NP-OVA (NP-OVA/Alum) mit Zusatz von hitzeinaktivierten Bordetella pertussis (B. pert.) als Adjuvans (NP-OVA/Alum + B. pert.) i.p. appliziert. Die lokale Immunisierung wurde speziell bei der Untersuchung im T-B Transfermodell angewendet. Mindestens 18 Stunden nach intravenöser Gabe der adoptiv transferierten Zellen erfolgte die Immunisierung mit NP-OVA/Alum + B. pert. Diese Immunisierung, die am Ansatz des Schwanzes gesetzt wurde, führt zur Aktivierung der NP-spezifischen B-Zellen in Abhängigkeit von den OVA-Peptid spezifischen T-Helferzellen im drainierenden, inguinalen Lymphknoten.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Aufreinigung von murinen Lymphozyten aus verschiedenen Geweben

Zur Gewinnung der Lymphozyten aus der Mausmilz wurde das Organ zuerst von Fett und Bindegewebe befreit und in zwei bis drei kleine Stückchen geschnitten. Dann wurden die Gewebestückchen mit einem Stempel einer 2 ml Spritze (Braun, Melsungen) durch ein 212 µm Metallsieb in PBS gedrückt. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt der gewonnenen Zellsuspension (380xg, 8 min, RT). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 5 ml ACK-Lösung resuspendiert und für 1 min unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert. Ziel dieses Arbeitsschrittes war es, die im Zellpellet verbleibenden Erythrozyten zu lysieren um eine relativ reine Lymphozytensuspension zu erlangen. Die Lysereaktion wurde mit

einer ausreichenden Menge PBS abgestoppt und die Zellsuspension wurde über ein 70 µm Nylonsieb gegeben, um mögliches Fett und Bindegewebe nochmals abzutrennen. Zur Verringerung des Flüssigkeitsvolumen der Zellsuspension wurde nochmals zentrifugiert und das Zellpellet in MACS-PBS, FACS-PBS oder Zellkulturmedium aufgenommen, je nachdem welcher Arbeitsschritt folgen sollte.

Für die Präparation der Lymphozyten aus dem Knochenmark wurde ein Hinterlauf der Maus im Beckenknochen abgetrennt und von Fell, Muskeln und Sehnen entfernt. Das Knochenmark wurde mit Hilfe einer Kanüle mit MACS-PBS aus dem Knochen herausgespült und anschließend abzentrifugiert (380xg, 8 min, RT). Da Knochenmark sehr stark durchblutet ist, ist die Lysierung der Erythrozyten nötig. Daher wurde auch hier der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 1 ml der ACK-Lösung resuspendiert, wobei die Inkubationszeit von 1 min bei RT nicht überschritten wurde. Nach Abstoppen der Lysereaktion mit PBS wurde die Zellsuspension über ein 70 µm Nylonsieb gegeben, um mögliche Knochenstücken von der Zellsuspension abzutrennen. Wie bei der Gewinnung der Splenozyten wurde auch die Knochenmarkszellsuspension nochmals zentrifugiert und das Zellpellet in FACS-PBS aufgenommen.

Zur Aufreinigung von Lymphozyten aus dem Blut wurden die Analysemäuse narkotisiert und retroorbital entblutet. Das Blut wurde in einem Gefäß aufgefangen, das eine ausreichende Heparinmenge enthielt, um eine Blutgerinnung zu vermeiden. Anschließend wurden die Erythrozyten mit 10 ml ACK-Lösung für 7 min bei RT unter leichtem Schwenken lysiert. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt (380xg, 8 min, RT) und das Zellpellet wurde für weitere Analysen in FACS-PBS aufgenommen.

Für die Gewinnung der Lymphozyten aus Lymphknoten wurden die zu analysierenden Lymphknoten entfernt und vorsichtig von Fett mit Hilfe eines Binokulars gesäubert. In eine Petrischale, die mit einer ausreichenden Menge Zellkulturmedium gefüllt ist, wurde ein 70 µm Nylonsieb gelegt. Darauf wurde das Gewebe überführt und in kleine Stückchen gerupft. In diesen Schritt ist es besonders wichtig, dass das Gewebe von Zellkulturmedium bedeckt ist und nicht austrocknen kann. Nun wurden die Gewebestückchen mit einem Stempel einer 1 ml Spritze (Braun, Melsungen) durch das Sieb sanft durchgedrückt. Die gewonnene Zellsuspension wurde anschließend abzentrifugiert (380xg, 8 min, RT) und das Zellpellet wurde für weitere Analysen in FACS-PBS aufgenommen.

Zur genauen Analyse der Zellzahl nach der Gewebeaufarbeitung wurde das Zellzählgerät Guava®PCA (Guava Technologies) verwendet. Der Ausschluss toter Zellen in der Suspension erfolgte mit der Zugabe von ViaCount Lösung, mit der die verdünnte Zellsuspension 3 min

inkubiert wurde. Anschließend wurden die Messdaten der Zellsuspension mit der ViaCount Software (Guava Technologies) auf lebende Zellen analysiert.

2.3.2 Anreicherung und Reinigung der Lymphozyten durch MACS

Um bestimmte Zelltypen aus einer komplexen Zellsuspension abzutrennen, bedient man sich bestimmter Oberflächenmarker der Zielzellen mit der Technik des Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS). Zur Durchführung dieser Technik wird die Zellsuspension mit sogenannten MicroBeads inkubiert. Diese MicroBeads sind etwa 50 nm große Magnetpartikel, die mit Antikörpern gekoppelt sind. Diese Antikörper wiederum binden spezifisch die gewünschten Oberflächenmarker der Zielzellen. Beim Durchfluss des Zellgemisches durch eine Säule, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist, werden die mit den MicroBeads markierten Zellen zurückgehalten und nicht an MicroBeads gebundene Zellen werden abgetrennt. Nach dem Entfernen des Magnetfeldes kann zudem auch die markierte Zellpopulation durch Spülen der Säule gewonnen werden und steht damit ebenfalls für weitere Versuche zur Verfügung.

Zur Aufreinigung naiver T-Zellen bediente man sich der positiven Selektion mit Hilfe des Oberflächenmarkers CD62L. Dazu wurde die Splenozytensuspension auf eine Konzentration von 2×10^8 Zellen/ml mit MACS-PBS eingestellt und mit Fc-Block inkubiert. Danach wurden MicroBeads, an die Antikörper gegen CD62L gebunden sind, in einem Verhältnis von 1:30 dazugegeben. Diese Suspension wurde anschließend auf die Säulen beladen, die sich im Magnetfeld befand. Somit wurden alle Zellen, die CD62L auf ihrer Oberfläche tragen, in der Säulenmatrix gehalten. Mit drei Waschschritten mit MACS-PBS wurden nicht gebundene Zellen von der Säule gewaschen. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld konnten nun die CD62L positiven Zielzellen mit MACS-PBS eluiert werden.

Eine negative Selektion wurde zur Aufreinigung von B-Zellen mit Hilfe des Oberflächenmoleküls CD43 durchgeführt. Hierbei handelte es sich bei den unmarkierten Zellen um die Zielzellen. Zur Durchführung wurde die Zellsuspension auf eine Konzentration von 3×10^8 Zellen/ml mit MACS-PBS eingestellt und mit den anti-CD43-MicroBeads im Verhältnis 1:15 inkubiert. Danach wurden die Säulen mit der Zellsuspension im Magnetfeld beladen. B-Zellen, die kein CD43 auf ihrer Oberfläche tragen, wurden im Durchfluss gesammelt und dreimaliges Waschen mit MACS-PBS sollte nicht gebundene Zielzellen von der Säule eluieren. Um die Reinheit der sortierten Zellen zu überprüfen bediente man sich der Durchflusszytometrie.

2.4 Die Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (FACS; Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln, wie z. B. Zellen oder Kunststoffkügelchen, in einem Flüssigkeitsstrom. Die Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern bestimmte Oberflächenmarker von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzelebene quantitativ zu untersuchen.

2.4.1 Färbung der Zelloberflächenantigene

Zur Analyse Oberflächen-spezifischer Antigene wurden pro Färbung $1-5 \times 10^6$ Zellen einer Suspension in eine Vertiefung einer 96er-Rundbodenplatte gegeben. Eine Inkubation mit Fc-Block sollte Fc-Rezeptoren absättigen und somit unspezifische Bindungen verhindert werden. Anschließend wurde für eine direkte Antigenmarkierung die Inkubation der in FACS-PBS verdünnten fluoreszenzmarkierten Antikörpern für 20 min auf Eis durchgeführt. Biotinylierte (Bio) oder Digoxigenin (Dig) gekoppelte Antikörper wurden in einem zweiten Schritt mit den entsprechenden Fluoreszenz markierten Streptavidin oder anti-Dig Antikörper entwickelt. Die Antikörperspezifität für das zu bindende Epitop konnte mit einem 100fachen Überschuss des nicht fluoreszenzmarkierten Antikörpers kontrolliert werden (kalte Blockade). Alle verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie (aufgelistet in Tab. 2) wurden vorab getestet, titriert und in unterschiedlichen Färbekombinationen eingesetzt, um optimale Färbequalität zu erzielen. Kurz vor der Messung am Durchflusszytometer wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4', 6'-Diamino-2-Phenylindol; Roche) zugesetzt. Dieser Farbstoff lagert sich nur dann in die DNA der Zelle ein, wenn die Zellmembran nicht mehr intakt ist (Tanious et al., 1992). Somit konnten tote Zellen über ein positives DAPI-Signal bei der Analyse ausgeschlossen werden.

2.4.2 Färbung intrazellulärer Antigene

Zunächst wurden die Oberflächenfärbungen und die Detektion toter Zellen mit dem Live/Dead® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen) durchgeführt, bevor die eigentliche Färbung intrazellulärer Proteine erfolgen konnte. Dafür wurden die Zellen fixiert und nachfolgend die Zellmembranen permeabilisiert. Die Fixierung erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Fixierungspuffer (Cytokine Buffer Set, eBioscience) und nach Herstellerhinweis. Danach erfolgte ein Waschschrift mit FACS-PBS und anschließend war es möglich, die Zellen bei 4°C bis zur weiteren Bearbeitung zu lagern. Die Färbung der intrazellulären Proteine erfolgte bei allen weiteren

Wasch- und Inkubationsschritte in dem entsprechenden kommerziellen Permeabilisierungspuffer (eBioscience).

2.4.3 Verwendete Antikörper

Bei den verwendeten Antikörpern handelt es sich entweder um kommerzielle oder um selbsthergestellte, aus Hybridomüberständen gewonnene Antikörper. Jeder eingesetzte Antikörper ist an ein Fluorophor gekoppelt, das ein spezifisches Anregungs- und Emissionsmaximum besitzt. Somit ist es möglich, in der Durchflusszytometrie mit unterschiedlichen Laseranregungen die verschiedenen Fluorophore zu unterscheiden. Folgende Fluorophore wurden entweder im Labor an die Antikörper gekoppelt oder waren schon an die kommerziellen Antikörper gebunden: FITC, PE, PE-Cy7, Cy5, A647, A700, APC-A750, Pacific Blue und Pacific Orange. Die biotinylierten oder digoxigenierten Sekundärantikörper waren mit diesen Fluorophoren gebunden: PerCP, A647, APC oder APC-Cy7.

Antigen	Klonname	Quelle	Referenz
Caspase-3 act	C92-605	kommerziell	BD Bioscience
BZR-B1-8i	Ac146	Hybridom	Reth et al., 1979
B Lin Neg	CD3 + CD8 + Ly-6G/C		
BrdU	B44	kommerziell	BD Bioscience
CD3	KT3	Hybridom	Tomonari et al., 1988
CD4	GK1.5	Hybridom	Dialynas et al., 1983
CD8	53-6.72	Hybridom	Ledbetter et al., 1980
CD19	1D3	Hybridom	Krop et al., 1996
CD21	7G6	kommerziell	BD Bioscience
CD23	B3B4	kommerziell	eBioscience
CD24 (HSA)	M1/69.16.11.HL	Hybridom	Aigner et al., 1997
CD25	2E4	Hybridom	Ortega et al., 1984
CD27 (CD70L)	LG.7F9	kommerziell	eBioscience
CD30	mCD30.1	kommerziell	eBioscience
CD38	90	kommerziell	eBioscience
CD43	S7	kommerziell	BD Bioscience
CD44	IM7.8.1	Hybridom	Lesley et al., 1982
CD45.1	A20	kommerziell	eBioscience
CD45.2	104	kommerziell	eBioscience
CD45R (B220)	RA3-6B2	Hybridom	Coffman et al., 1983
CD54	3E2	Hybridom	Berendt et al., 1992
CD62L	MEL-14	Hybridom	Gallatin et al., 1983
CD69	H1.2F3	kommerziell	eBioscience
CD70 (CD27L)	FR70	kommerziell	eBioscience
CD80	1G10	Hybridom	Nabavi et al., 1992

Antigen	Klonname	Quelle	Referenz
CD86	GL1	Hybridom	Freeman et al., 1993
CD90.1 (Thy-1.1)	OX-7	Hybridom	Campbell et al., 1982
CD95	15A7	kommerziell	eBioscience
CD103 (α E Intergrin)	2E7	kommerziell	eBioscience
CD127 (IL-7R)	A7R34	Hybridom	Sudo et al., 1993
CD137-L (4-1BBL)	TKS-1	kommerziell	eBioscience
CD138 (Syndecan-1)	281-2	kommerziell	eBioscience
CD183 (CXCR3)	220802	kommerziell	R&D
CD184 (CXCR4)	2B11	kommerziell	eBioscience
CD185 (CXCR5)	2G8	kommerziell	BD Bioscience
CD267 (TACI)	eBio8F10-3	kommerziell	eBioscience
CD268 (BAFF-R)	eBio7H22-E16	kommerziell	eBioscience
CD272 (BTLA)	mBT-1622	Hybridom	eigener Antikörper
CD273 (PD-L2)	TY25	kommerziell	eBioscience
CD274 (PD-L1)	HIH5	kommerziell	eBioscience
CD275 (ICOS-L)	MIL-5733	Hybridom	eigener Antikörper
CD278 (ICOS)	MIC-280	Hybridom	Löhning et al., 2003
CD279 (PD-1)	J43	kommerziell	eBioscience
GC B-Zellen	PNA	kommerziell	Vector
GL7 (GC B-Zellen)	GL7	Hybridom	Laszlo et al., 1993
HVEM	mHV-1411	Hybridom	eigener Antikörper
IgD	11-26c	Hybridom	Nitschke et al., 1993
IgG2a	LO-MG2a-9	kommerziell	Serotec
IgM	Bet-2	Hybridom	Kung et al., 1981
Lambda (λ 1 + λ 2 + λ 3 leichte Kette)	R26-46	kommerziell	BD Biosciences
Ly-6G/C (Gr-1)	RB6-8C5	Hybridom	Hestdal et al., 1991
MHC-II	M5/114.15.2	Hybridom	Bhattacharya et al., 1981
NP spezifische B-Zellen	NP-APC	kommerziell*	eigene Herstellung
PS (apoptotische Zellen)	Annexin-V	kommerziell	BD Bioscience
TZR-V α 2	B20.1	kommerziell	eBioscience
TZR-V β 5	MR9-4	kommerziell	BD Bioscience

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Antikörpern in der Durchflusszytometrie

Angegeben sind die spezifischen Epitope und Klonnamen der verwendeten Antikörper, deren Herkunft und Referenz.

*Cyanotech (für das APC) und Biosearch Technologies (für das NP).

2.4.4 Generierung und Auswertung der Durchflusszytometrie Daten

Die Messung der markierten Zelloberflächenantigene wurde an einem BD™ LSRII Durchflusszytometer (BD Biosciences) mit der Analyse Software FACSDiVa von BD durchgeführt. Für die weitere Auswertung der gemessenen Daten wurde die Software FlowJo (Tree Star Inc.) verwendet. Die Strategie zum Ausschluss der Dubletten, autofluoreszenter Zellen, toter Zellen und Lymphozyten, die in der weiteren Analyse stören könnten, ist in Abb. 3 dargestellt. Repräsentative

Ergebnisse in den Abbildungen sind im Histogramm oder Contour Plot dargestellt. Dabei wurde entweder der prozentuale Anteil positiver Zellen eines bestimmten Antigens oder die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß für die Antigenexpressionsstärke angegeben, wobei die Zahlen auf die vorherige Markierung bezogen sind.

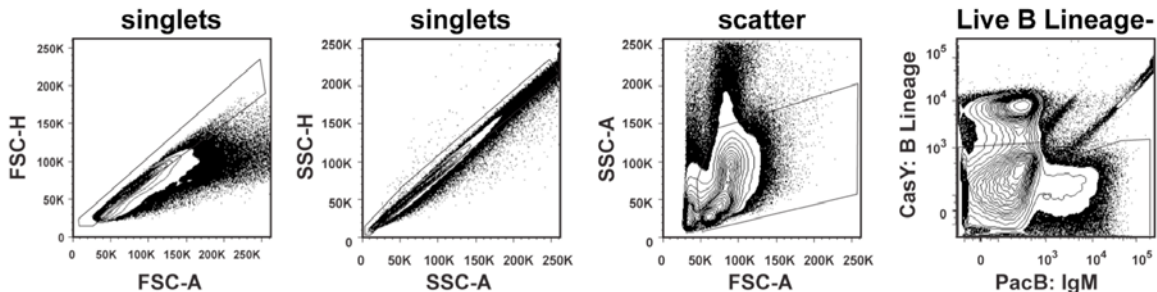


Abb. 3: Erste Schritte bei der durchflusszytometrischen Analyse

Bei jeder Auswertung der gemessenen Zellen wurden zuerst mögliche Dubletten im Vorwärts- und Seitwärtsscatter eliminiert. Anschließend wurden die gewonnenen Einzelzellen (singlets) mit dem sogenannten scatter gate spezifisch auf Lymphozyten markiert. Danach erfolgte der Ausschluss autofluoreszenter Zellen, DAPI-positiven Zellen, also tote Zellen, und Lymphozyten, die für die weitere Analyse nicht nötig sind. Die gezeigte Strategie wurde für alle durchflusszytometrischen Analysen verwendet und wird in folgenden Darstellungen nicht mehr gezeigt.

2.5 Untersuchungen zur Zellproliferation

2.5.1 Analyse der Proliferation mittels CFSE-Markierung

Zur Analyse der Proliferation bestimmter Zellpopulationen im Tier bedient man sich der CFSE-Markierung. Der Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Carboxyfluoreszein Succinimidyl Ester) besteht aus einem Fluoreszenzmolekül, das eine Succinimidyl Ester Gruppe und zwei Acetathälften besitzt. Behandelt man Zellen mit diesem Farbstoff, so diffundiert dieser frei in die Zellen ein. Ein Abspalten der Acetatgruppen des CFSE durch intrazelluläre Esterasen verhindert das Auswandern des Fluoreszenzfarbstoffes aus der Zelle. Somit bleibt dieser Stoff im Zytoplasma wobei er keinerlei Einfluss auf die Zellfunktion hat. Bei jeder Zellteilung wird das Zytoplasma und auch das CFSE auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt, wodurch sich die relative Fluoreszenzintensität des CFSE genau halbiert. Daher erlaubt diese Methode, spezifische Populationen proliferierender Zellen zu untersuchen und die fortschreitenden Zellgenerationen zu identifizieren (Lyons et al., 1994). Dafür wurden Splenozyten mit einer 5 μ M CFSE Lösung für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen für adoptive Transfer Experimente verwendet. Da CFSE ein Emissionsmaximum bei 525 nm besitzt, konnten CFSE-markierte Zellen in der Durchflusszytometrie ohne die Verwendung von Fluoreszenzantikörpern gegen CFSE im FITC Kanal detektiert werden. Zur Einteilung der unterschiedlichen Proliferationsstufen der B-Zellen wurden drei Gruppen eingeführt. Die erste Gruppe mit einem sehr hellen CFSE-Signal definiert B-Zellen von der Generation 0 (Gen 0), d. h. diese B-Zellen sind nicht aktiviert und haben sich

noch nicht geteilt. Zur zweiten Gruppe, also Generation 1 bis 6 (Gen 1-6), gehören B-Zellen, die sich über ein mittelhelles CFSE-Signal auszeichnen und somit schon einige Zellteilungszyklen durchlaufen haben. Ein negatives CFSE-Signal definiert B-Zellen der Generation 7+ (Gen7+), die schon mehr als sieben Zellteilungen durchgeführt haben.

2.5.2 Analyse der Proliferation mittels BrdU-Markierung

Zur Evaluierung der Zellproliferation in einer bestimmten Zeitspanne bietet sich die Zellmarkierung mit Bromdesoxyuridin (BrdU) an. BrdU ist ein chemisches Analogon des Thymidins bzw. Desoxyuridins und kann während der S-Phase der Zellproliferation anstelle des Nukleotids Desoxythymidinphosphat in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Das eingebaute BrdU wird mit einem spezifischen anti-BrdU Fluoreszenzantikörper in der Durchflusszytometrie detektiert. Zur Durchführung dieser Methode wurde zwei Stunden vor der Analyse den Mäusen 1 mg BrdU intravenös appliziert und, nach Tötung der Tiere, die entsprechenden Organe präpariert. Die Detektion des BrdU-Einbaus erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Färbekits (BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit, BD Biosciences), wobei Fixierung, Permeabilisierung und Färbung mit APC-konjugiertem anti-BrdU gemäß den Herstellerangaben durchgeführt wurden. Anschließend wurden die gefärbten Zellen in der Durchflusszytometrie analysiert.

2.6 Untersuchung apoptotischer Zellen

2.6.1 Analyse apoptotischer Zellen mittels Annexin-V Markierung

In frühen Apoptosestadien finden Änderungen der Zellmembran statt, z. B. die Translokation von Phosphatidylserin, das normalerweise nur auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist, auf die Außenseite der Membran. Annexin-V ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin. Dieses Protein kann somit als empfindliche Sonde für die Phosphatidylserin Exposition auf der Membranaußenseite aller exprimierenden apoptotischen Zellen eingesetzt werden und ist deswegen zur Detektion apoptotischer Zellen geeignet. Zur Detektion dieser Zellen wurde nach der Oberflächenfärbung wegen Ca^{2+} -Bindung von Annexin-V die Inkubation mit Annexin V-Cy5 (BD Biosciences) in 10 mM Hepes pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 und 0,01% NaN_3 bei RT vorgenommen. Zur Analyse apoptotischer Zellen in der Durchfluss-zytometrie wurde zusätzlich zu Annexin-V DAPI in Kombination verwendet. Über die Helligkeit von DAPI ist es möglich, früh apoptotische von spät apoptotischen Zellen zu unterscheiden (Vermes et al., 1995). In der Analyse wurden die DAPI^{low} $\text{Annexin}^{\text{high}}$ exprimierenden Zellen mit einbezogen.

2.6.2 Analyse apoptotischer Zellen mittels Nachweis der Caspaseaktivität

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis apoptotischer Zellen ist die Detektion von Enzymen mit proteolytischer Aktivität, den Caspasen. Schon in der Initiationsphase der Apoptose werden Caspasen aktiviert, die ihrerseits in der Effektorphase die Caspase-Kaskade auslösen. Diese Enzyme sind aktiv beim Abbau der Zellkernmembran und des Zytoskeletts beteiligt und unterdrücken die DNA-Reparatur, wodurch sie eine zentrale Rolle beim programmierten Zelltod spielen. Die Markierung der Caspasen ist möglich durch die Verwendung von Zellmembran durchlässigen, nichttoxischen fluoreszierenden Caspaseinhibitoren. Hierfür wurde ein kommerzielles Färbekit nach Herstellerangaben verwendet (FLICA Apoptosis Detection Kit Caspase Assay, Immunochemistry Technologies). Der Fluoreszenz markierte Caspaseinhibitor (FLICA) FAM-VAD-FMK bindet an die Caspasen-1 und Caspasen 3-9 und markiert somit apoptotische Zellen in der Durchflusszytometrie.

2.7 Bestimmung der Serumimmunglobuline mittels ELISA

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Zur Bestimmung der Konzentration von Serumimmunglobulinen wird in der Regel die „indirekte“ ELISA Methode angewandt.

2.7.1 Herstellung der Mausseren für die ELISA-Tests

Für die Gewinnung der Seren wurden die Analysetiere narkotisiert, das Blut retroorbital entnommen und zur Blutgerinnung für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden durch Zentrifugation die zellulären Blutbestandteile abgetrennt und der Überstand zur weiteren Analyse im ELISA bei -20°C gelagert.

2.7.2 Durchführung der murinen ELISAs

Zur Durchführung des „indirekten“ ELISAs wurden 96er Mikrotiterplatten mit einem niedrig substituierten NP-BSA (NP3-BSA) oder einem hoch substituierten NP-BSA (NP28-BSA) beschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert. Danach wurden die Mikrotiterplatten mit einem ELISA-Washer gewaschen und mit einer Blocklösung die freien Bindungsstellen innerhalb der Vertiefungen abgesättigt. Nach 1 h erfolgte wieder ein Waschschriff und anschließend die Inkubation der Serumproben mit den entsprechenden Standardverdünnungsreihen (1 h, RT). Nach

einem erneuten Waschschrift erfolgte die Inkubation mit einem biotinylierten Detektionsantikörper für 1 h bei RT. Daraufhin wurde abermals gewaschen und gebundenes Biotin durch Streptavidin-HRP detektiert (30 min, RT). Bei Verwendung von Sekundärantikörpern, die schon mit Biotin-Streptavidin-HRP gekoppelt waren, konnte auf diesen Arbeitsschritt verzichtet werden. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Farbreaktion durch die Umsetzung des farblosen Substrats TMB (3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin, Sigma-Aldrich) durch HRP in ein blaues Produkt. Diese Farbreaktion wurde, abhängig von der Substratumsetzung, nach etwa 5-10 min mit 1 M Schwefelsäure gestoppt. Mit einem Mikrotiterplattenphotometer wurden die Platten bei 450 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) vermessen. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software Revelation von Life Science. Die Tab. 3 gibt einen Überblick der durchgeführten ELISAs mit den entsprechenden Standards und Detektionsantikörpern.

ELISA	Beschichtung	Standard (Klon)	Detektion
IgM	NP3-BSA oder NP28-BSA	IgM (267.7 μ)	Ziege-anti-Maus IgM-HRP (μ Kette spezifisch) (SouthernBiotech)
IgG ₁	NP3-BSA oder NP28-BSA	IgG ₁ (18-1-16)	Ziege-anti-Maus IgG ₁ -HRP (γ_1 Kette spezifisch) (SouthernBiotech)
IgG _{2a}	NP3-BSA oder NP28-BSA	IgG _{2a} (S43-10)	Ziege-anti-Maus IgG _{2a} -HRP (γ_{2a} Kette spezifisch) (SouthernBiotech)
IgG _{2b}	NP28-BSA	IgG _{2b} (D3-13F1)	Ziege-anti-Maus IgG _{2b} -HRP (γ_{2b} Kette spezifisch) (SouthernBiotech)
IgG ₃	NP28-BSA	IgG ₃ (S24/63/63)	Ziege-anti-Maus IgG ₃ -HRP (γ_3 Kette spezifisch) (SouthernBiotech)
IgM ^a	NP3-BSA oder NP28-BSA	IgM ^a (267.7 μ)	Biotinylierter Maus-anti-Maus IgM ^a (Igh-6a) (Klon DS-1) (BD Bioscience)
IgG ₁ ^a	NP3-BSA oder NP28-BSA	IgG ₁ ^a (18-1-16)	Biotinylierter Maus-anti-Maus IgG ₁ ^a (Igh-4a) (Klon 10.9) (BD Bioscience)
IgG _{2a} ^a	NP3-BSA oder NP28-BSA	Laborstandard	Biotinylierter Maus-anti-Maus IgM ^a (Igh-1a) (Klon 8.3) (BD Bioscience)

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Antikörpern bei den ELISA Tests

Angegeben sind die unterschiedlichen ELISA Typen mit den entsprechenden Reagenzien zur Plattenbeschichtung. Die verwendeten Standards sind mit ihren Klontypen angegeben. Weiterhin sind die Detektionsantikörper und deren Bindungsspezifität aufgelistet.

2.8 Die Immunhistologie

Als Immunhistologie bezeichnet man eine Methode, die es ermöglicht, Proteine, wie z. B. Oberflächenantigene, mit Hilfe von Antikörpern mikroskopisch sichtbar zu machen. Dadurch kann unter anderem bestimmt werden, in welchen Geweben das Antigen oder sogar in welchem Zellkompartiment es lokalisiert ist. Der Antigennachweis basiert auf der Affinität von Antikörpern zu dem entsprechenden Epitop, die im Idealfall zu einer spezifischen und starken Bindung erfolgt.

Die verwendeten Antikörper sind mit einem Detektionssystem gekoppelt, das es ermöglicht, seine Antigenbindung sichtbar zu machen. Mit Hilfe vielfältiger Detektionssysteme können schon geringe Epitopmengen dargestellt werden, wobei das Signal nur am Ort des Epitops spezifisch verstärkt werden soll.

2.8.1 Gewebeaufarbeitung für die Immunhistologie

Zur Analyse von Oberflächenantigenen in der Immunhistologie wurden Mäuse, die zu untersuchenden Lymphknoten und Milzen entfernt und diese möglichst schnell von Fett oder Bindegewebe befreit. Danach wurden die präparierten Lymphknoten auf ein Stückchen Aluminiumfolie gelegt, mit TissueTec bedeckt und anschließend in flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Die Milzen wurden in gleicher Weise in 0,9 % NaCl-Lösung eingefroren. Die Gewebe konnten nun für weitere Untersuchungen bei -70°C gelagert werden. Diese Technik der Kryokonservierung ermöglicht einen guten Erhalt der Zelloberflächenantigenen, wobei die Gewebemorphologie jedoch verändert sein kann.

2.8.2 Anfertigung der Gewebeschnitte für die Immunhistologie

Zur Anfertigung von Kryoschnitten wurden die Gewebe im Kryotom auf eine Temperatur von 18°C gebracht und anschließend 8 µm dicke Kryoschnitte angefertigt. Die Objektträger mit den geschnittenen Geweben wurden über Nacht bei RT getrocknet und am nächsten Tag für 10 min in Aceton fixiert. Diese Art der Fixierung führt zu einer Proteinpräzipitation, wobei die Tertiärstruktur zerstört wird, die Primär- und Sekundärstruktur aber erhalten bleibt. Nach der Fixierung konnten die Objektträger für die weitere Färbeprozedur verwendet werden oder bei -70°C weiter gelagert werden.

2.8.3 Multiple Antigenmarkierung mit dem VECTASTAIN® System

Der Vorteil dieser multiplen Antigenmarkierung besteht darin, dass bis zu drei verschiedene Oberflächenantigene in einem Gewebeschnitt angefärbt werden können. Auf eine sequenzielle Inkubation der Antikörper konnte verzichtet werden, wenn diese an unterschiedliche Haptene gekoppelt waren. Zur Durchführung der eigentlichen Immunhistologie wurden die bei -70°C gelagerten Objektträger aufgetaut und nochmals für 10 min in Aceton fixiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit einem Fettstift umrandet, um das Ineinanderlaufen der Antikörperlösungen benachbarter Schnitte zu verhindern. Bei der multiplen Antigenmarkierung mit

dem VECTASTAIN® System wurde unter anderem die Detektion mit HRP-gekoppelten Antikörpern verwendet. Um falsch positive Antikörperbindungen zu verhindern, musste die endogene Peroxidase blockiert werden. Granulozyten, Mastzellen und Erythrozyten gehören zu den Zelltypen, die Peroxidasen enthalten. Daher wurden die Kryostatschnitte für 1 h bei 37°C mit Peroxidase-Blocklösung in einer Glasküvette inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurde zweimal für 5 min in PBS gewaschen. In der nächsten Inkubation sollten unspezifische Bindungsstellen in den Geweben abgesättigt werden. Dies erfolgte mit einer NEN-Blockierlösung, die zusätzlich Fc-Block enthält, womit die Gewebeschnitte für 1 h bei RT inkubiert wurden. Danach erfolgte bei RT die einstündige Inkubation der Primärantikörper, die mit FITC, Digoxigenin oder Biotin gekoppelt waren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den gewünschten Sekundärantikörpern. Die Inkubationszeiten für anti-FITC-HRP, anti-Dig-HRP, anti-FITC-AP und anti-Dig-AP betrugen 45 min bei RT. Die Detektion von biotinylierten Antikörpern wurden mit dem VECTASTAIN® ABC Kit (Vectorlabs) nach Protokoll durchgeführt. Danach erfolgte die Inkubation der Enzymsubstrate bis die gewünschte Farbintensität erreicht wurde. Die verwendeten Substrate DAB (ImmPACT DAB Peroxidase Substrate, Vectorlabs), Vector Red (Vector Red AP Substrat Kit I, Vectorlabs) und Vector Blue (Vector Blue AP Substrat Kit III, Vectorlabs) wurden, wie von der Firma VectorLabs vorgeschlagen, verwendet. Die Tab. 4 gibt einen Überblick über die eingesetzten Kombinationsmöglichkeiten der Primär- und Sekundärantikörper und die daraus resultierende Variation der Auswahl der Substrate.

Hapten des Primärantikörpers	Sekundärantikörper	Substrat
FITC	Anti-FITC-HRP	DAB
	Anti-FITC-AP	Vector Red oder Vector Blue
Digoxigenin	Anti-Dig-HRP	DAB
	Anti-FITC-AP	Vector Red oder Vector Blue
Biotin	Vectastain ABC Kit	Vector Red oder Vector Blue

Tab. 4: Übersicht der verschiedenen Farbkombinationen beim VECTASTAIN® Systems

Angegeben sind die unterschiedlichen Haptene der Primärantikörper, die mögliche Detektion mit den entsprechenden Sekundärreagenzien und die anschließende Enzymfarbentwicklung mit den POD oder AP Substraten. Dadurch erschließt sich eine Vielzahl von unterschiedlichen Farbkombinationen zur Markierung der Epitope in der Immunhistologie.

2.9 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse der gewonnenen Daten wurde die Software Prism (GraphPad Software Inc.) verwendet. Jedes Symbol repräsentiert ein Einzeltier, der Strich kennzeichnet den Median für alle zugehörigen Tiere einer Gruppe und Sternsymbole zeigen die Signifikanz im Falle eines Unterschiedes zwischen den Gruppen. Die Berechnung der p-Werte möglicher Unterschiede wurde

2. Material und Methoden

mit dem Mann-Whitney U Test analysiert, wobei ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant angenommen wurde und mit einem Stern (*) gekennzeichnet wurde. P-Werte $< 0,01$ erhielten zwei Sterne (**) und höchst signifikante Unterschiede mit einem P-Wert $< 0,001$ wurden mit drei Sternen (***) charakterisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von ICOS auf den B-Zellpool

ICOS-defiziente Patienten zeigen eine schwere Störung des humoralen Immunsystems, die sich in einer sehr geringen B-Zellfrequenz im Blut und einer mangelnden Antikörperantwort gegen Pathogene im Vergleich zu gesunden Probanden manifestiert. Da ICOS-defiziente Patienten stark immun geschwächt sind, ist eine Blutabnahme jedoch nur sehr selten durchführbar. Weiterhin ist es nicht möglich, sekundär lymphatische Organe dieser Patienten zu untersuchen. Um den molekularen Mechanismus dieser Effekte aber besser verstehen zu können, ist es notwendig, ein *in vivo* Mausmodell zu etablieren, das die Untersuchungen an ICOS-defizienten Patienten ersetzt. Zu diesem Zweck wurden C57BL/6 ICOS KO Mäuse und C57BL/6 Kontrolltiere (WT) analysiert, um die Rolle von ICOS und dessen Einfluss auf den B-Zellpool besser verstehen zu können.

3.1.1 Charakterisierung der Zellbestandteile im Mausblut

Zur Charakterisierung der Bestandteile im Mausblut wurden von C57BL/6 WT und ICOS KO Tieren Blut entnommen und in einem vollautomatischen Hämatologie Flowzytometriesystem analysiert. So wurden ca. 18×10^{14} Erythrozyten/l und ungefähr 15×10^9 Lymphozyten/l bei beiden Gruppen vom Gerät gezählt (Abb. 4A). Zusätzlich wurden die Blutproben der gleichen Tiere in der Durchflusszytometrie untersucht. Die Frequenz der B-Zellen, definiert über eine positive CD19 Expression, beträgt in beiden Gruppen ca. 50 % bezogen auf alle Lymphozyten (Abb. 4B). Da im Blut verschiedene B-Zellsubpopulationen vorkommen, bedient man sich der unterschiedlichen IgM und IgD Expression zur genaueren Einteilung. Eine Koexpression von IgM und IgD definiert reife, naive B-Zellen. Bei IgM+IgD- B-Zellen handelt es sich zum einen um B-Zellen, die sich im T1 Stadium befinden und von Knochenmark über den Zentralsinus in die Milz einwandern, um dort zu reifen, naive B-Zellen zu entwickeln. Weiterhin definiert aber auch eine IgM+IgD- Expression eine aktivierte B-Zelle, die noch keinen Ig-Klassenwechsel vollzogen hat. Tragen B-Zellen weder IgM noch IgD auf ihrer Oberfläche, so handelt es sich im Blut um Zellen mit vollständigem Ig-Klassenwechsel. Die Analyse zeigte bei ICOS KO Tieren eine sehr leicht verringerte Frequenz der naiven B-Zellen (IgM+IgD+ B-Zellen) und eine stark verringerte Frequenz der IgM-IgD- B-Zellen um etwa 50% im Vergleich zu den WT Kontrolltieren (Abb. 4C). Damit unterscheiden sich ICOS KO Mäuse hinsichtlich der B-Zellzahlen im Blut klar von den ICOS-Defizienz Patienten. Einzig die verringerte Frequenz klassengewechselter B-Zellen ist in beiden Fällen gleich.

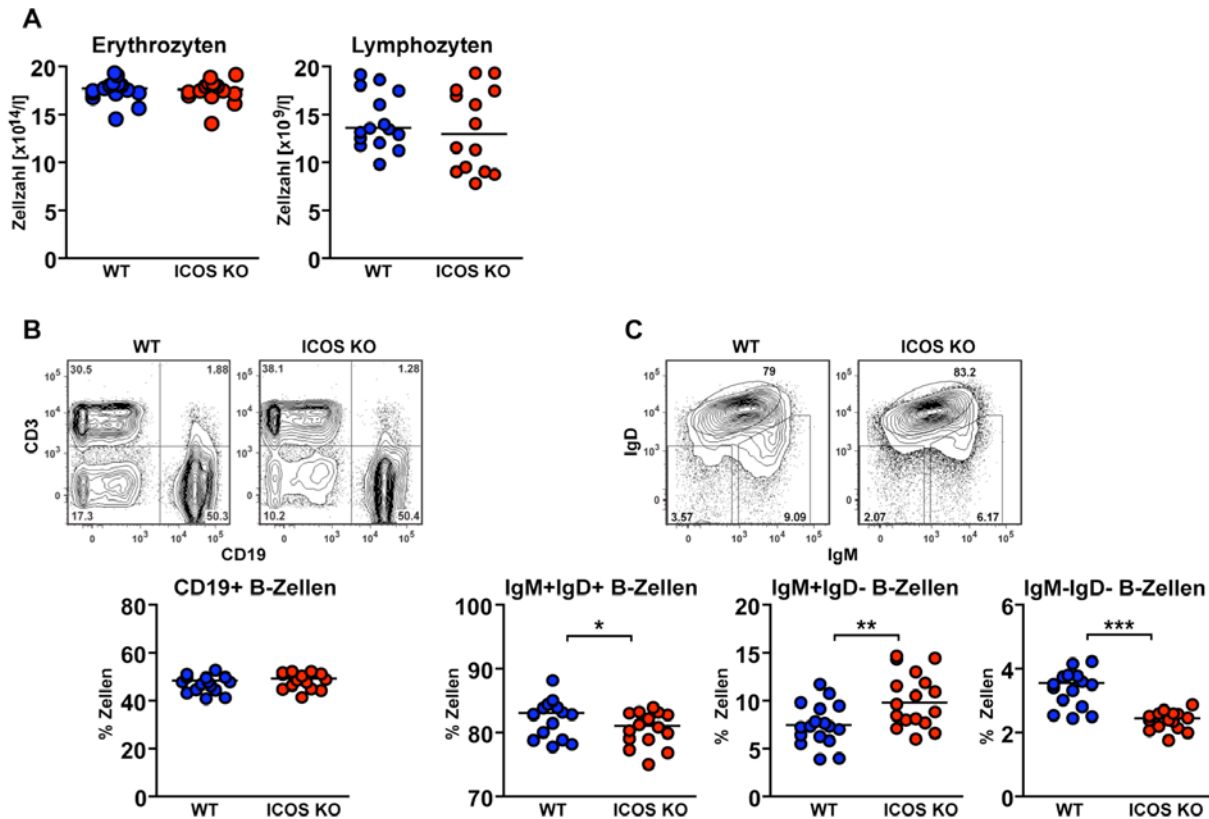


Abb. 4: Zellbestandteile und B-Zellsubpopulationen im Mausblut

Dargestellt ist die Analyse der absoluten Zellzahl und Zell-Subpopulationen aus Vollblut von 15 C57BL/6 WT und 15 ICOS KO Tieren. Analysiert wurde zum einen die absolute Zellzahl der Erythrozyten und Lymphozyten (A). In der Durchflusszytometrie wurde die B-Zellfrequenz der WT und ICOS KO Mäuse untersucht (B). Zur genaueren Ermittlung des B-Zellpools der beiden Gruppen wurden die B-Zellen auf ihre IgM und IgD Expression analysiert (C). Mehrfach unabhängig durchgeführte Experimente kommen zu diesen gezeigten Ergebnissen.

3.1.2 Charakterisierung der B-Zellsubpopulationen in der Milz

Die Milz gehört, wie die Lymphknoten, zu den sekundär lymphatischen Geweben, in denen die adaptive Immunantwort statt findet. Weiterhin ist die Milz der Ort der letzten Etappe der B-Zellreifung, bei der sich transitionelle B-Zellen zu reifen, naiven B-Zellen entwickeln. Da Untersuchungen dieses Organs in ICOS-Defizienz Patienten natürlich nicht durchführbar sind, ist es umso wichtiger, ein funktionierendes Mausmodell zu entwickeln, das den Einfluss von ICOS auf den B-Zellpool aufklärt. Daher wurden Milzen von WT und ICOS KO Mäusen in der Durchflusszytometrie auf ihre B-Zellfrequenzen und B-Zellsubtypen analysiert. Als erstes wurde gezeigt, dass die absoluten Zellzahlen, die aus einer Milz gewonnen werden konnten, in beiden Gruppen gleich waren (Daten nicht gezeigt). Auch die Lymphozytenfrequenz in der Milz, definiert über eine positive Expression von CD45 auf der Zelloberfläche, unterschied sich nicht zwischen den WT und ICOS KO Mäusen. Mehr als die Hälfte der Lymphozyten exprimieren CD19 auf ihrer Zelloberfläche und bilden somit den B-Zellpool in der Milz. Die Frequenz der B-Zellen ist bei beiden Gruppen vergleichbar. (Abb. 5A). Im nächsten Schritt wurde eine grobe Einteilung der

B-Zellsubpopulation mit Hilfe der unterschiedlichen IgM und IgD Expression der B-Zellen durchgeführt. Reife, naive B-Zellen und folliculäre B-Zellen der Milz tragen sowohl IgM als auch IgD auf ihren Zelloberflächen. B-Zellen, die nur IgM exprimieren und IgD runterreguliert haben, könnten entweder transitionelle B-Zellen, Marginalzonen-B-Zellen oder aktivierte B-Zellen sein, die noch keinen vollständigen Ig-Klassenwechsel durchgeführt haben. Eine IgM-IgD- Expression könnte ein Merkmal einer aktivierten B-Zelle mit vollständigen Ig-Klassenwechsel oder einer Plasmazelle sein. In ICOS KO Tieren konnte so eine signifikant geringere Frequenz der IgM+IgD+ B-Zellen im Vergleich zu WT Tieren festgestellt werden. Die Frequenz der IgM-IgD- B-Zellen in ICOS KO Mäusen ist sogar um Faktor 2 verringert. Einen signifikanten Unterschied zwischen der WT und ICOS KO Gruppe konnte bei der Frequenz der IgM+IgD- B-Zellen nicht beschrieben werden (Abb. 5B). Zusammenfassend kann man festhalten, dass in den Milzen der ICOS Tiere weniger IgM+IgD+ B-Zellen und klassengewechselte B-Zellen vorkommen als in den WT Mäusen.

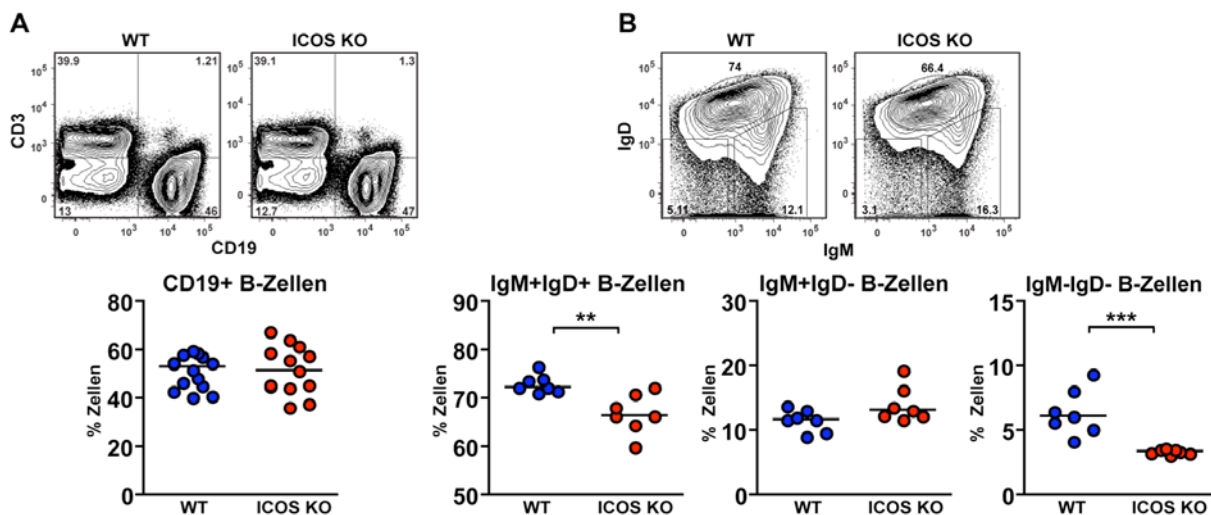


Abb. 5: B-Zellpopulationen in der Mausmilz

Dargestellt sind die durchflusszytometrischen Analysen von C57BL/6 und ICOS KO Tieren. Die B-Zellfrequenz wurde mit einer CD19+ Expression bestimmt (A). Die B-Zellsubpopulationen wurden mit Hilfe unterschiedlicher IgM und IgD Expressionen eingeteilt (B). Diese Daten wurden mit mehrfach unabhängig durchgeführten Experimenten bestätigt.

Weitere Untersuchungen sollten klären, in wie weit sich das Fehlen von ICOS auf die B-Zellreifung auswirkt. Aus diesem Grund sollten die unterschiedlichen B-Zellsubpopulationen mit einer genaueren Einteilung der Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie untersucht werden. Mit einer unterschiedlichen Expression der Oberflächenmarker CD21 und CD23 ist es möglich, immature, folliculäre, Marginalzonen-B-Zellen und Plasmazellen zu definieren. Eine doppelt negative Expression von CD21 und CD23 beschreibt die immatures B-Zellen oder aber Plasmazellen. Eine Koexpression von CD21 und CD23 definiert die folliculären B-Zellen, während eine CD21+CD23- Expression die Marginalzonen-B-Zellen beschreibt. Analysen von Mausmilzen

3. Ergebnisse

zeigen eine deutlich geringere Frequenz der CD21-CD23- B-Zellen in ICOS KO Tieren (etwas 12% in WT und 7% in ICOS KO). Die Frequenzen der follikulären B-Zellen und der Marginalzonen-B-Zellen unterscheiden sich zwischen den beiden Gruppen nicht (Abb. 6A). Dieses Ergebnis ist ein weiteres Indiz für eine gestörte B-Zellreifung und Ig-Klassenwechsel bei einer ICOS-Defizienz. Das Repertoire der reifen B-Zellpopulation ist aber von einer fehlenden ICOS-Expression nicht betroffen. Zur genaueren Untersuchung der B-Zellentwicklung in der Milz dient CD93 als ein weiterer wichtiger Marker. Dieses Oberflächenmolekül ist nur auf unreifen B-Zellen exprimiert, die vom Knochenmark über die PALS in die B-Zellfollikel wandern. Gereifte, follikuläre B-Zellen und Marginalzonen-B-Zellen tragen diesen Marker nicht. Die Analyse in der Durchflusszytometrie zeigt eine signifikant geringere Expression von CD93 auf B-Zellen der ICOS KO Tiere (Abb. 6B). In Milzen von WT Tieren finden sich im Schnitt 23% CD93+ B-Zellen während die Frequenz dieser B-Zellen bei ICOS KO Tieren nur bei 15% liegt. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass ICOS-defiziente Tiere weniger unreife B-Zellen und somit einen Defekt in der B-Zellentwicklung haben. In welchem Stadium der B-Zellentwicklung ICOS eine Rolle spielt, soll in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

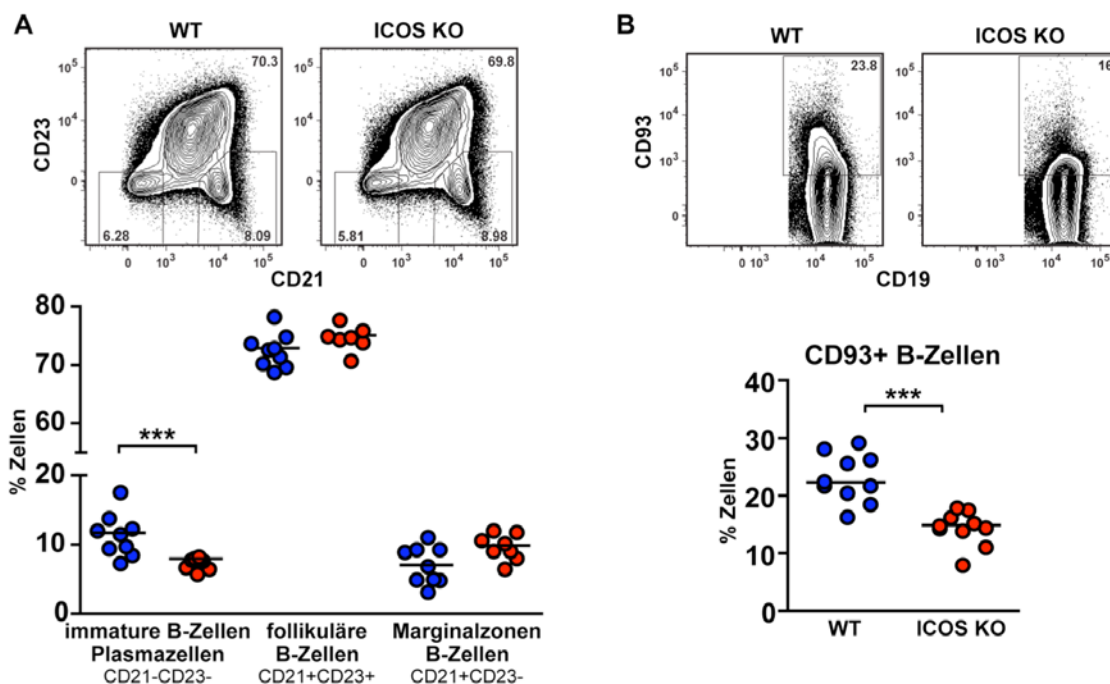


Abb. 6: Zellpopulationen reifer B-Zellen in der Mausmilz

Gezeigt sind Durchflusszytometrie Analysen der verschiedenen B-Zellsubpopulationen in der Milz. Reife B-Zellen wurden mit Hilfe unterschiedlicher CD21 und CD23 Expression eingeteilt. Blaue Kreise repräsentieren die WT Gruppe, rote Kreise die ICOS KO Gruppe (A). Zur Differenzierung unreifer B-Zellen wurde die Expression von CD93 genutzt (B). Mehrere Experimente führten zu den gleichen Ergebnissen.

3.1.3 Die B-Zellentwicklung im Knochenmark

Da das Fehlen von ICOS einen deutlichen Effekt auf die Generierung neuer B-Zellen (siehe verringerte CD93 Expression in Abb. 6B) hat, soll nun analysiert werden, in welcher B-Zellentwicklungsstufe ICOS eine Rolle spielt. Daher wurde das Knochenmark von C57BL/6 WT und ICOS KO Mäusen auf ihre verschiedenen B-Zellentwicklungsstadien in der Durchflusszytometrie analysiert. Die einzelnen B-Zellsubpopulationen werden nach der Expression ihrer verschiedenen Oberflächenmarker (Abb. 1) eingeteilt. Um die Frequenzen der Subpopulationen der B-Zellen im Knochenmark zu bestimmen wurde die Analyse von Tung et al. modifiziert. Die Abb. 7 zeigt die Strategie, um die Entwicklungsstufen der B-Zellen zu identifizieren.

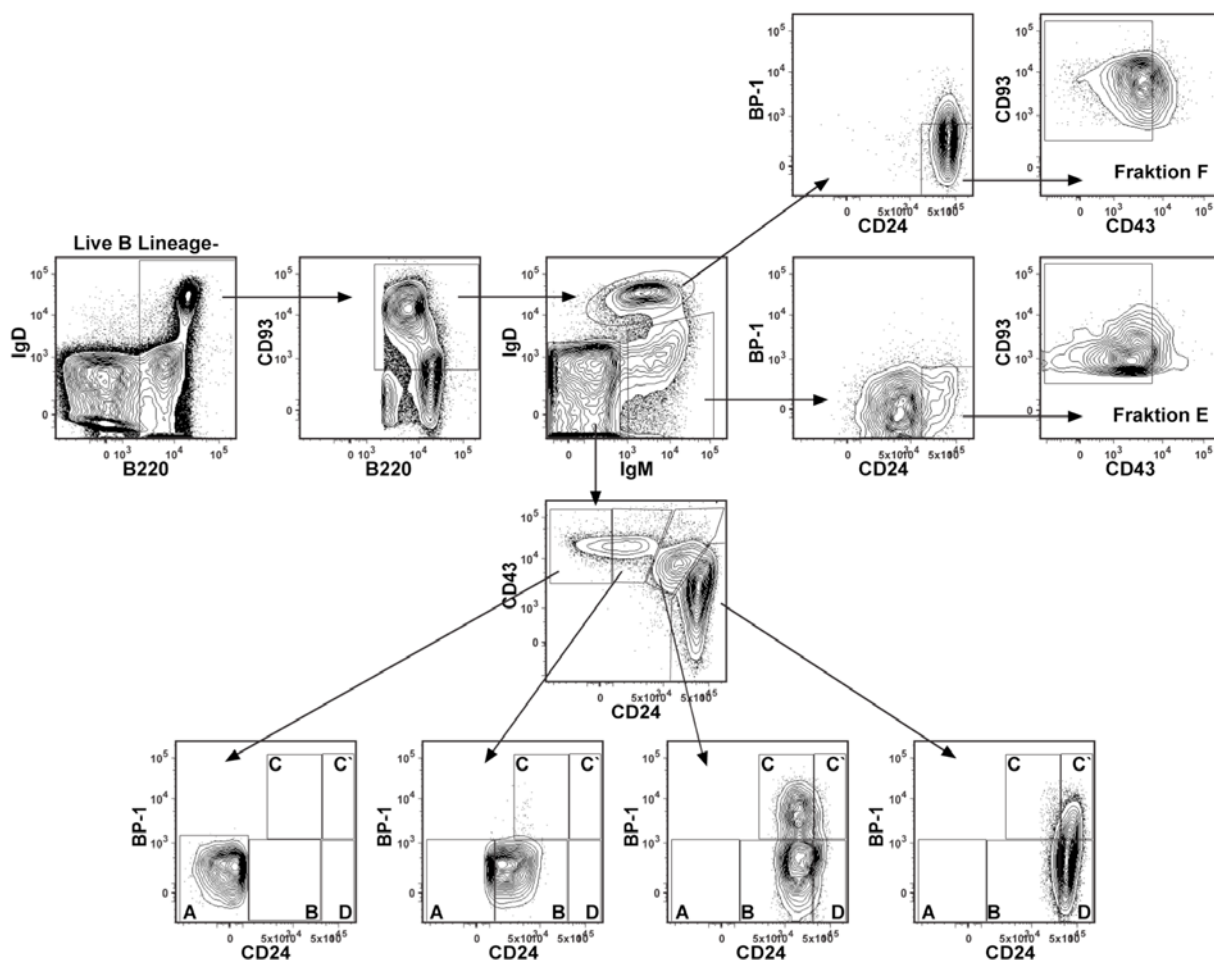


Abb. 7: FACS-Auswertung für die B-Zellentwicklungsstufen im Knochenmark

Zu Beginn der Analyse wurden mögliche Dubletten, autofluoreszente Zellen und Lymphozyten, die für die weitere Analyse störend sein könnten (CD3⁺, CD8⁺ und Ly-6G/C⁺ Zellen) eliminiert. Anschließend folgt die Markierung der B-Zellen. Im Knochenmark wird generell B220 als Marker für B-Zellen benutzt, da CD19 erst in späteren Entwicklungsstufen exprimiert wird. Im nächsten Schritt trennt man die frühen Vorläufer-B-Zellen von den reifen B-Zellen, die im Blut das Knochenmark durchströmen, mit Hilfe von CD93. Die schwach CD93 positiven Zellen könnten möglicherweise sehr frühe Vorläufer-B-Zellen sein, die CD93 noch hoch regulieren. Daher gehören sie zu den Subpopulationen der zu untersuchenden Zelltypen und sollten für die weitere Analyse nicht ausgeschlossen werden. Im nächsten Schritt werden mit Hilfe der unterschiedlichen IgM und IgD Expressionen die B-Zellen in drei große Gruppen unterteilt: Gruppe 1 definiert die frühen Vorläufer-B-Zellen, die weder IgM noch IgD auf ihrer Oberfläche tragen. Die

3. Ergebnisse

zweite Gruppe wird mit Hilfe der positiven IgM Expression bestimmt, wohingegen bei Gruppe 3 sowohl IgM als auch IgD auf der Oberfläche zu finden ist. Nun teilt man die frühen Vorläufer-B-Zellen der Gruppe 1 mit Hilfe der Marker CD24 und CD43 in vier weitere Untergruppen ein. Diese werden nochmals über die BP-1 Expression in die jeweiligen Entwicklungsstufen Fraktion A, Fraktion B, Fraktion C, Fraktion C' und Fraktion D untergliedert. Die zweite und dritte Gruppe werden ebenfalls mit CD24, BP-1 und CD43 genauer in die Fraktion E und Fraktion F definiert. Zur Auswertung werden die Frequenzen der einzelnen Fraktionen auf die B220 Frequenz bezogen.

Die Analyse des Knochenmarks in der Durchflusszytometrie zeigt, dass es keinen Unterschied in der B220 Frequenz zwischen WT und ICOS KO Tieren gibt, wobei eine starke Varianz der B220 Frequenz innerhalb der Gruppen auffällt (Abb. 8A). Die CD93 Expression der B-Zellen im Knochenmark ist deutlich stärker ausgeprägt als in der Milz. So besitzen rund 75% der B-Zellen CD93 als Oberflächenmarker. Da die B-Zellentwicklung ihre Anfänge im Knochenmark hat und CD93 ein Marker für frühe, unreife B-Zellen ist, ist diese Beobachtung jedoch nicht verwunderlich. Die unterschiedliche CD93 Expression zwischen den beiden Gruppen, die in der Milz zu sehen war, ist im Knochenmark aber nicht zu erkennen (Abb. 8B). Ob nun ICOS eine Rolle in der Entwicklung der verschiedenen B Zellstadien spielt, ist in Abb. 8C zu sehen. Gezeigt sind die Zellfrequenzen der einzelnen B-Zellentwicklungsstufen. Es ist deutlich erkennbar, dass die Frequenzen der einzelnen Fraktionen der Vorläufer-B-Zellen in WT und ICOS KO Tieren sehr stark variieren. Daher ist es nicht möglich, zu sagen, dass die Zellfrequenzen in der ICOS KO Gruppe geringer ausfallen als in der WT Gruppe. Vielmehr sieht es so aus, dass es keinen Unterschied zwischen WT und ICOS KO Tieren gibt. Daher kann man vermuten, dass ICOS keinen Einfluss auf die ganz frühe Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark hat. Hierzu passt auch das Expressionsmuster von ICOS-L (Abb. 8D). Hier wurde die Expression von ICOS-L auf den frühen Vorläufer-B-Zellen in WT und ICOS KO Tieren analysiert. Es ist beschrieben, dass in ICOS KO Mäusen die ICOS-L Expression im Vergleich zu WT Tieren erhöht ist, um das Fehlen von ICOS zu kompensieren. Daher eignen sich diese Tiere besonders gut, um die Hochregulation von ICOS-L zu untersuchen. Die Analyse der ICOS-L Expression zeigt deutlich, dass der Partner von ICOS erst in der Fraktion F exprimiert wird. Somit ist klar, dass ICOS in frühen Vorläufer-B-Zellen keine Rolle spielen kann, da auch der Partner fehlt. Dieses Ergebnis und die vergleichbare CD93 Expression in WT und ICOS KO Tieren schließt eine Rolle von ICOS in der frühen B-Zellentwicklung im Knochenmark aus. Da erst in der Milz ein signifikant reduzierter Anteil unreifer B-Zellen bei ICOS KO Tieren zu sehen ist, deutet alles darauf hin, dass ICOS eine Rolle in der späteren B-Zellentwicklungsphase in der Milz spielt.

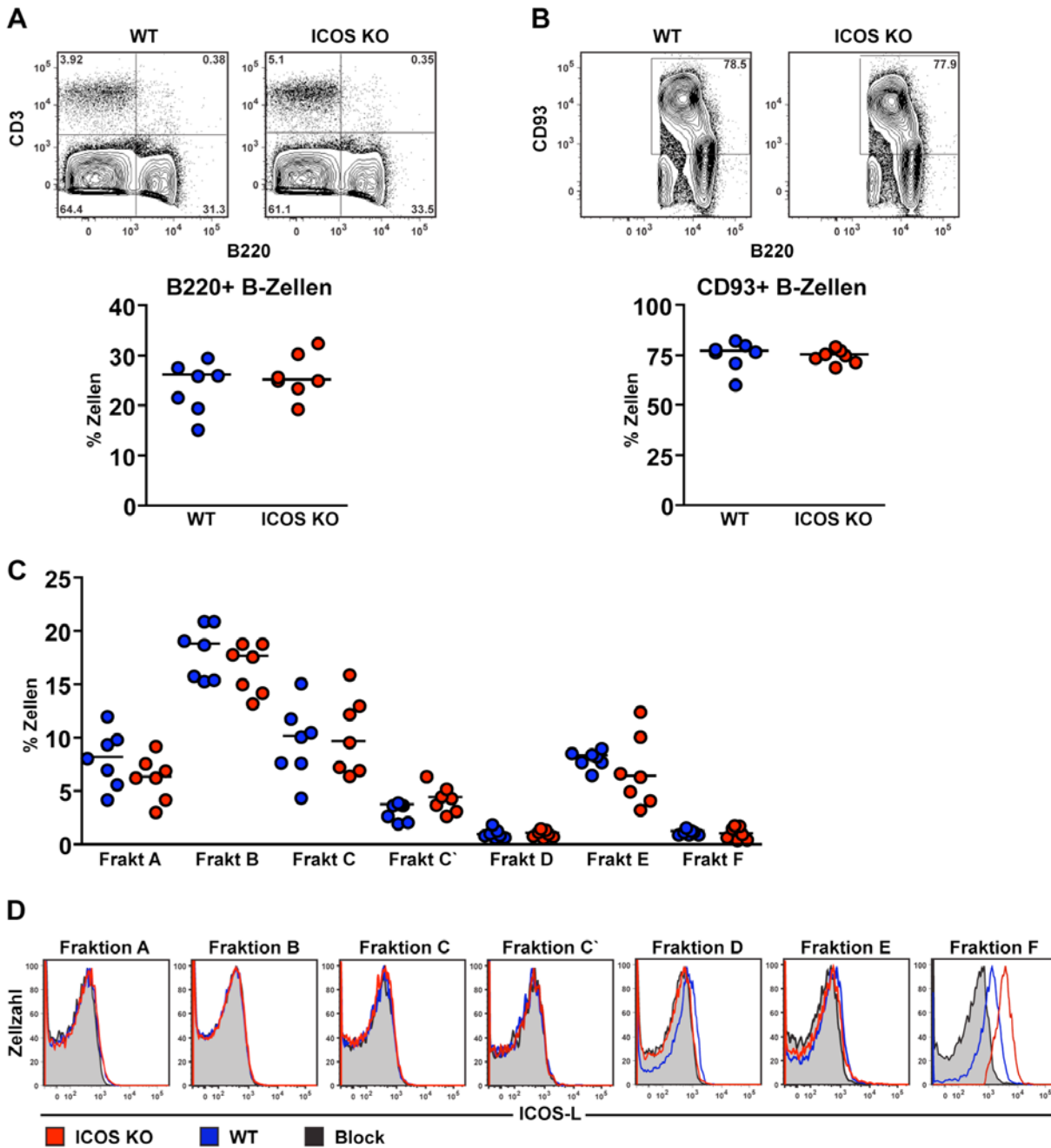


Abb. 8: Analyse der B-Zellentwicklungsstufen im Knochenmark

Diese Abb. zeigt die durchflusszytometrische Analyse des Knochenmarks von C57BL/6 und ICOS KO Tieren. Die Frequenz der B-Zellen wurde mit einer positiven B220 Oberflächenexpression definier (A). Unreife B-Zellen im Knochenmark werden mit CD93 detektiert, die Frequenz dieser B-Zellen ist auf B220 bezogen (B). Weiterhin ist die Zellfrequenz der einzelnen Fraktionen der B-Zellentwicklung im Knochenmark dargestellt. Blaue Kreise repräsentieren die WT Gruppe, rote Kreise die ICOS KO Gruppe (C). In Histogrammen ist die ICOS-L Expression der einzelnen Vorläufer B-Zellfraktionen dargestellt. Die schwarze Linie dient als Kontrolle. Die rote Linie zeigt die ICOS-L Expression bei ICOS KO Mäusen, die blaue Linie die ICOS-L Expression bei WT Tieren (D). Mehrfach unabhängig durchgeführte Experimente repräsentieren die gezeigten Ergebnissen.

3.1.4 Die B-Zellentwicklung in der Milz

Da ICOS-L auf den Vorläufer-B-Zellen, die sich im Knochenmark befinden, nicht exprimiert wird und der Marker CD93, der frühe B-Zellen definiert, sowohl auf WT als auch auf ICOS KO

3. Ergebnisse

B-Zellen in gleicher Intensität zu finden ist, kann vermutet werden, dass ICOS erst in späteren Entwicklungsstufen der B-Zellen eine Rolle spielt. In den einzelnen Stufen dieses Prozessen exprimieren die B-Zellen, wie die Vorläufer-B-Zellen im Knochenmark, spezifische Oberflächenmarker, die man zur Identifizierung in der Durchflusszytometrie nutzen kann (Abb. 1). Um die einzelnen Entwicklungsstadien der unreifen B-Zellen zu identifizieren, wurde auch hier eine Strategie für die durchflusszytometrische Auswertung entwickelt, die der Vorgehensweise für die B-Zellen im Knochenmark ähnelt (Abb. 9).

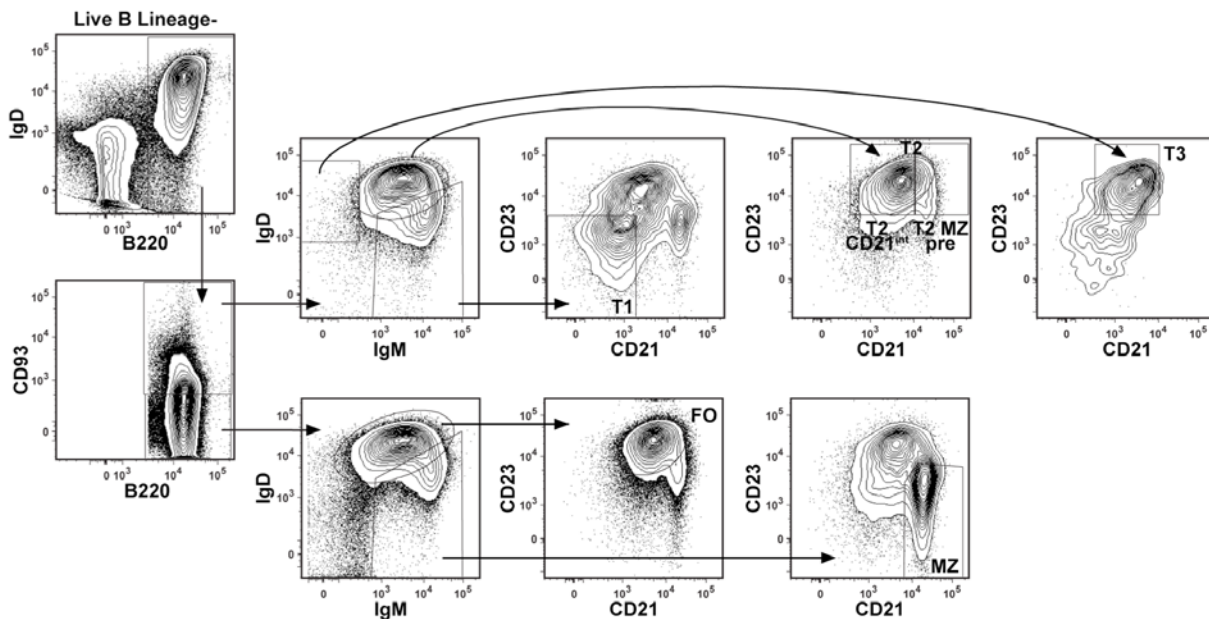


Abb. 9: FACS-Auswertung für die B-Zellentwicklungsstufen in der Milz

Zuerst wurden mögliche Dubletten, autofluoreszente Zellen und Lymphozyten, die für die weitere Analyse nicht relevant sind, ausgeschlossen. B-Zellen werden über den Marker B220 definiert. Die Trennung der unreifen B-Zellen von den reifen B-Zellen erfolgt mit Hilfe von CD93. Nun definiert man die beiden Gruppen über IgM und IgD weiter in ihre Entwicklungsstufen. Da IgM und IgD in der B-Zellreifung hoch und runterreguliert werden, erlangt man auch hier keine abgegrenzten Populationen. Somit ist es sinnvoll, dass sich die Markierungen überschneiden, damit man fälschlicherweise Zellen, die für die Statistik wichtig sind, nicht abschneidet. Die erste Gruppe, d. h. die CD93 positiven B-Zellen sind jetzt in drei Untergruppen mittels IgM und IgD definiert. Jede Untergruppe wird dann über die CD21 und CD23 Expression in die T1, T2 CD21^{int}, T2 MZ pre, T2 und T3 Subpopulationen eingeteilt. Die zweite Gruppe, deren Zellen CD93 nicht auf der Oberfläche tragen, ist über IgM und IgD Expression in zwei Untergruppen eingeteilt. Auch hier entscheidet die CD21 und CD23 Expression, ob es sich um folliculäre oder Marginalzonen-B-Zellen handelt. Zur Auswertung sind die Frequenzen der einzelnen Subpopulationen auf die B220 Frequenz bezogen.

Die B-Zellfrequenz des Stadiums T1 ist bei WT und ICOS KO Tieren vergleichbar. Danach steigt die B-Zellfrequenz beim Übergang in das T2 Stadium bei den WT Tieren auf 14% an. Bei den KO Tieren findet man nur ca. 10% B-Zellen des Stadiums T2. Untersucht man das T2 Stadium genauer und teilt dies in die Stadien T2 CD21^{int} und T2 Marginalzonen-Vorläufer (T2 MZ pre) auf, so erkennt man deutlich, dass der Großteil der T2 Zellfraktion aus T2 MZ pre B-Zellen besteht. WT Mäuse besitzen signifikant mehr T2 MZ pre Zellen als ICOS KO Tiere. Beim Stadium T2 CD21^{int} ist die Zellfrequenz in beiden Mäusegruppen vergleichbar. Im Stadium T3 lässt sich ebenfalls kein

Unterschied zwischen den Tiergruppen beobachten (Abb. 10A). Eine weitere wichtige Information ist, in welchem Stadium der B-Zellentwicklung in der Milz ICOS-L exprimiert wird. Diese Untersuchung wurde mit WT und ICOS KO Tieren durchgeführt und zeigt, dass der Interaktionspartner von ICOS erst schwach im T1 Stadium und mit steigender Tendenz in den darauffolgenden Stadien exprimiert wird. Da man einen signifikanten Unterschied der B-Zellfrequenzen zwischen WT und ICOS KO Mäusen im T2 B-Zellentwicklungsstadium beobachtet, bei dem auch erst ICOS-L exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass ICOS einen Einfluss auf die B-Zellentwicklung im T2 Stadium hat. Die Stadien T1 und T3 und die reifen B-Zellsubpopulationen, wie die follikulären und Marginalzonen-B-Zellen zeigen keinen Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen zeigen und sind möglicherweise von einer ICOS-Defizienz nicht betroffen (Abb. 10B).

Eine Möglichkeit, die die geringe B-Zellfrequenz im Stadium T2 bei ICOS KO erklären könnte, wäre eine stärkere Proliferation der WT B-Zellen oder ein verstärktes Absterben der ICOS KO B-Zellen. Um diese Fragestellung zu klären, wurde der Einbau von BrdU und die Anfärbung von Annexin-V der T1, T2 und T3 Stadien untersucht. BrdU, als chemisches Analogon des DANN-Vorläuferthymidins, kann in die neu synthetisierte DNA während der S-Phase des Zellzyklus eingebaut werden. Daher wird diese Chemikalie zur Markierung proliferierender Zellen benutzt, indem man sie den Analysetieren appliziert. Zur Untersuchung apoptotischer Zellen nutzt man die Translokation von Phosphatidylserin in der Zellmembran, die bei der Apoptose geschieht. Dieses Protein wird hochaffin von Annexin-V gebunden, wodurch es als empfindliche Sonde zur Detektion apoptotischer Zellen geeignet ist. Die Abb. 10C zeigt den Einbau von BrdU in den einzelnen B-Zellstadien. So findet man bei WT und ICOS KO Mäusen ca. 10% BrdU+ Zellen im Stadium T1 bezogen auf alle B-Zellen. Ein starker BrdU-Einbau ist im Stadium T2 zu beobachten. Hier sind etwa 45% der T2 WT B-Zellen und sogar 60% der T2 ICOS KO B-Zellen positiv für BrdU. Dies bedeutet, dass es zu einer starken Zellproliferation beim Übergang von T1 zu T2 kommt wobei die ICOS KO B-Zellen des T2 Stadiums stärker proliferieren als die WT B-Zellen. Der BrdUEinbau im Stadium T3 ist zu vernachlässigen. Die Analyse der Frequenz apoptotischer Zellen zeigt eine sehr starke Varianz der Annexin-V+ Zellen im T1 Stadium. Es scheint jedoch, dass es sowohl im Stadium T1 und auch im T2 Stadium keinen Unterschied in der Frequenz der apoptotischen Zellen zwischen der WT und ICOS KO Gruppe gibt (Abb. 10D). Die vergleichbare Frequenz apoptotischer Zellen im Stadium T1 bei beiden Gruppen widerspricht der Theorie, dass ein verstärktes Absterben der ICOS KO B-Zellen beim Übergang vom T1 zum T2 Stadium zur geringeren T2 Zellfrequenz führt. Der BrdU-Einbau, der eine verstärkte Proliferation im T2 Stadium bei den ICOS KO Tieren zeigt, widerspricht hingegen den Daten der Abb. 10A. Sollten

B-Zellen in ICOS KO Tieren beim Übergang von T1 zu T2 stärker proliferieren als die WT B-Zellen, müsste man auch eine erhöhte Zellfrequenz im T2 Stadium bei ICOS KO Mäusen detektieren, was aber nicht der Fall ist. Ein bekannter Marker, der für die B Zellreifung in der Milz und das Überleben der B-Zellen verantwortlich ist, ist BAFF-R. Gross et al. zeigten, dass ein Signal über BAFF besonders für das Überleben der T2 B-Zellen nötig ist (Gross et al., 2001). Möglicherweise hat das Fehlen von ICOS einen Effekt auf die BAFF-R Expression. Diese könnte bei ICOS KO Tieren verringert sein, wodurch die B-Zellreifung gestört sein könnte und die verringerte Frequenz der T2 B-Zellen in ICOS KO Mäusen erklärt werden könnte. Daher wurde die BAFF-R Expression der einzelnen B-Zellentwicklungsstufen in der Milz von WT und ICOS KO Mäusen untersucht. Deutlich erkennbar ist, dass BAFF-R erst ab dem T2 Stadium exprimiert wird. Jedoch ist die signifikant erhöhte Expression von BAFF-R auf ICOS KO B-Zellen der Stadien T2 und T3 überraschend (Abb. 10E). Daher ist die verringerte B-Zellfrequenz im T2 Stadium nicht durch eine mangelnde BAFF-R Expression zu erklären. Jedoch führt eine ICOS-Defizienz zu einer Hochregulation von BAFF-R in den T2 und T3 B-Zellstadien.

Die Untersuchungen der B-Zellentwicklung ICOS-defizienter Mäuse zeigt einen Phänotyp, der sich von ICOS-defizienten Patienten unterscheidet. Bei diesen Analysen wurden Mäuse im Alter von etwa sechs Wochen untersucht, was umgerechnet einem Alter von fünf Menschenjahren entspricht. Die Erkrankung einer ICOS-Defizienz beim Menschen manifestiert sich jedoch erst im Jugend- bzw. Erwachsenenalter. Dies könnte eine Erklärung sein, weshalb der Phänotyp beim Menschen in einigen wesentlichen Aspekten sich so sehr von dem der Maus unterscheidet. Daher wurden ICOS KO Mäuse im Alter von sechs Monaten mit Kontrollmäusen verglichen. Aber auch in älteren Mäusen konnte man keine Veränderung des B-Zellpools erkennen, der dem von ICOS-Defizienz Patienten ähnelt. Weiterhin könnte die Diskrepanz des B-Zellpools bei Menschen und Mäusen auch daran liegen, da ICOS KO Mäuse in einer SPF-Zucht und Umgebung gehalten werden, wohingegen ICOS-Defizienz Patienten im Laufe ihres Lebens immer wieder mit Pathogenen in Berührung kommen. Daher könnte die Untersuchung von älteren Mäusen, die einen wiederholten Antigenkontakt erfahren haben, interessant sein, ob in dieser Situation die B-Zellzahlen ebenfalls abnehmen. Indem man ICOS KO und WT Tiere mehrfach in regelmäßigen Zeitabständen mit einem Cocktail von hitzeinaktivierten Bakterien immunisiert hat, sollte diese Umwelt der ICOS-Defizienz Patienten nachempfunden werden. Aber auch dieses Vorgehen führte ebenfalls zu keiner Veränderung des B-Zellpools, obwohl sich die Immunisierung der Mäuse über mindestens acht Monaten hinweg zog. Daher kann vermutet werden, dass eine ICOS-Defizienz bei Mäusen sich nicht so stark auf den B-Zellpool auswirkt als bei einer ICOS-Defizienz beim Mensch (Daten nicht gezeigt).

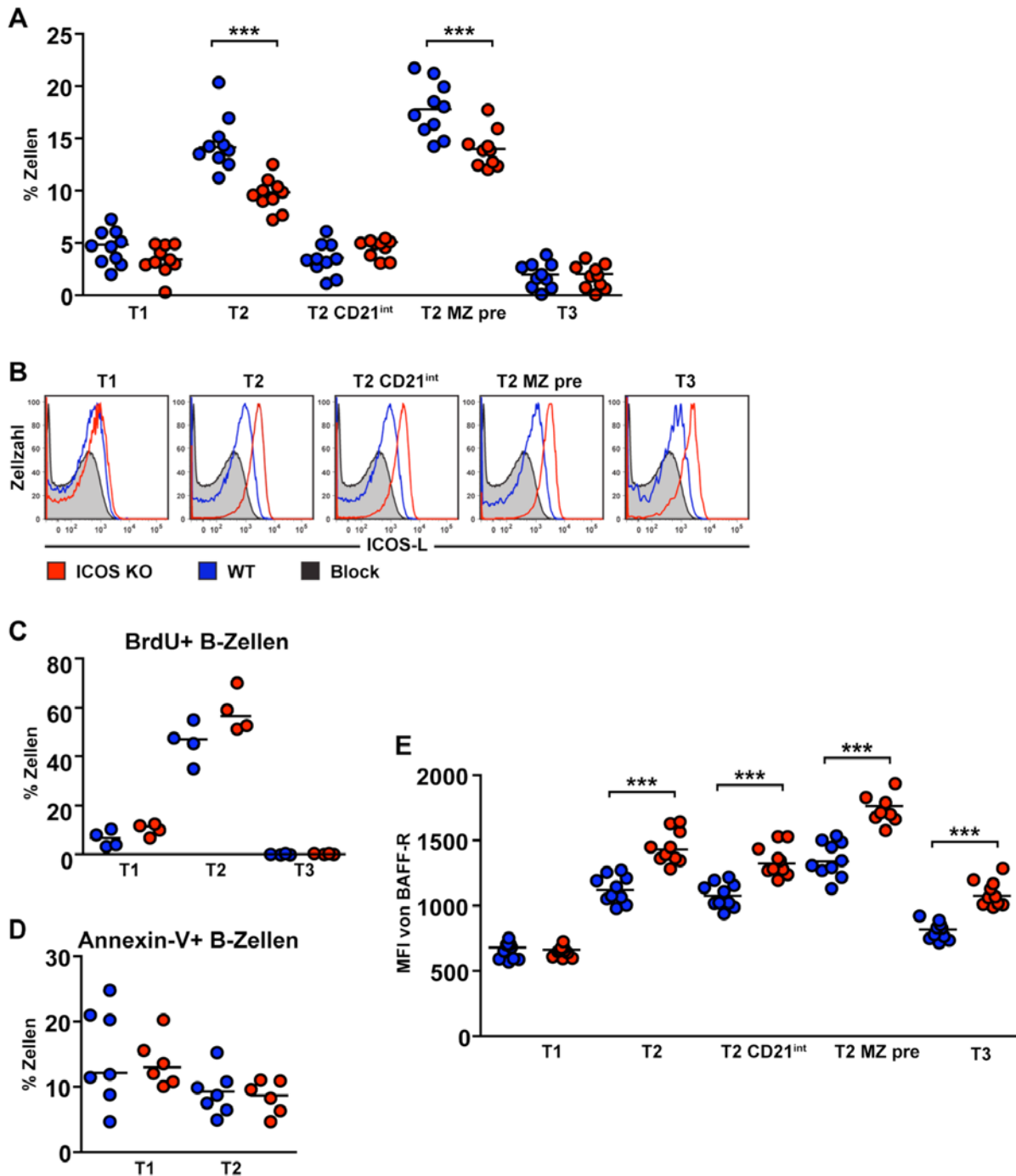


Abb. 10: Analyse der B-Zellentwicklungsstufen in der Milz

Die durchflusszytometrische Analyse der B-Zellentwicklung mit ihren verschiedenen Entwicklungsstufen in der Milz. Blaue Kreise repräsentieren die WT Mäuse, rote Kreise die ICOS KO Tiere. Gezeigt sind die B-Zellfrequenzen der einzelnen Entwicklungsstufen (A). Weiterhin wurde die ICOS-L Expression der einzelnen B-Zellentwicklungsstufen untersucht (B). Unterschiede zwischen WT und ICOS KO B-Zellen bei der Proliferation wurde mit Hilfe des BrdU-Einbaus analysiert (C). Mit der Markierung von Annexin-V wurden apoptotische Zellen in den einzelnen B-Zellentwicklungsstufen nachgewiesen (D). Zudem wurde die Expression von BAFF-R (als Fluoreszenzintensität MFI) in WT und ICOS KO Mäusen der einzelnen B-Zellentwicklungstufen aufgezeigt (F). Mehrfach unabhängig durchgeführte Experimente repräsentieren die gezeigten Ergebnissen.

3.2 Die Etablierung eines adoptiven Transfermodells zur Untersuchung der frühen T-B Kooperation

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein *in vivo* Mausmodell zu entwickeln, das es ermöglicht, die Rolle von ICOS in der frühen T-B Zellinteraktion bei einer Immunantwort zu untersuchen. Dafür werden OVA-Peptid spezifische T-Zellen und NP-spezifische B-Zellen zusammen in C57BL/6 WT oder ICOS KO Mäuse transferiert. Die anschließende Immunisierung mit NPOVA und hitzeinaktivierten B. pert. als Adjuvans führt zur Aktivierung der NP-spezifischen B-Zellen in Abhängigkeit von den OVA-Peptid spezifischen T-Helferzellen (Abb. 2).

3.2.1 Verwendete Mäusestämme

Als Donoren für die transgenen T-Zellen wurden OT-II Mäuse (Barnden et al., 1998) verwendet. Diese Tiere tragen einen transgenen T-Zellrezeptor (TZR) gegen das Peptid OVA323-339 im Komplex mit I-A^b. Da es aber keinen murinen Antikörper gibt, der diesen TZR erkennt, wurden die OT-II Tiere mit B6.PL Mäusen gekreuzt. Die generierten, transgenen T-Zellen exprimieren nun Thy-1.1 auf ihrer Oberfläche, den man mit einem spezifischen Antikörper detektieren kann und unterscheiden sich von den T-Zellen der Rezipienten, die Thy-1.2 auf ihrer Oberfläche tragen. Da die Rolle von ICOS bei der T-B Kooperation untersucht werden soll, wurden zusätzliche Kreuzungen von OT-2 und ICOS KO Mäusen (Özkaynak et al., 2001) unternommen. Somit erlangte man Mäuse, deren transgene T-Zellen ICOS exprimieren bzw. Mäuse, deren transgene T-Zellen kein ICOS auf der Oberfläche tragen und daher keine Kostimulation über ICOS/ICOS-L erfahren können. 98% aller CD4⁺ T-Zellen der OT-2 Mäuse tragen den transgenen TZR. Ein repräsentatives Beispiel der Durchflusszytometrieanalyse der transgenen T-Zellfrequenzen in Abb. 11A dargestellt.

Als Donoren für die transgenen B-Zellen wurden B1-8i Mäuse (Sonoda et al., 1997) verwendet, die im Labor von Klaus Rajewsky entwickelt wurde. Der B1-8 B-Zellrezeptor (BZR) dieser Mäuse entspricht der Keimbahnsequenz eines prototypischen BZR gegen Nitrophenol (NP) bei C57BL/6 Tieren (Reth et al., 1978) und kann mit einem murinen Antikörper sehr spezifisch detektiert werden (Reth et al., 1979). Da es sich bei diesen Mäusen um BZR-Knockin Mäuse handelt, sind die B-Zellen in der Lage auch einen Ig-Klassenwechsel durchzuführen, womit auch die extrafollikuläre Plasmazellreaktion untersucht werden kann. Zur weiteren Untersuchung einer T-Zell-abhängige Immunantwort bieten sich die Mäuse besonders an da die humorale Immunantwort gegen NP-OVA T-Zell-abhängig ist. Da der BZR NP nur in der Kombination einer schweren Kette mit einer leichten Kette vom Typ λ erkennen kann, detektiert man mit dem murinen Antikörper Ac146 nur

5 bis 6 % transgene B-Zellen in diesen Tieren (Abb. 11B). Um diese Frequenz zu erhöhen, wurden die B1-8i Mäuse mit CkT Tieren gekreuzt (Zou et al., 1993). Diese Mäuse tragen eine Mutation im κ -Locus und können nur B-Zellrezeptoren generieren, die mit λ leichten Ketten kombiniert sind. Da es mehrere Isotypen der λ leichten Kette gibt, nämlich $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$ und λx , gibt es mehrere Möglichkeiten, mit welcher λ leichten Kette mit einer schweren Kette kombiniert wird. Der transgene BZR erkennt NP möglicherweise aber nicht mehr, wenn λx mit der schweren Kette kombiniert ist. Dies könnte erklären, warum nur rund 80% der B-Zellen der neu gekreuzten B1-8i/CkT Tiere NP erkennen. Die fehlenden 20% sind vermutlich B-Zellen, deren BZR eine Kombination aus λx leichten Ketten und schweren Kette sind (Abb. 11C).

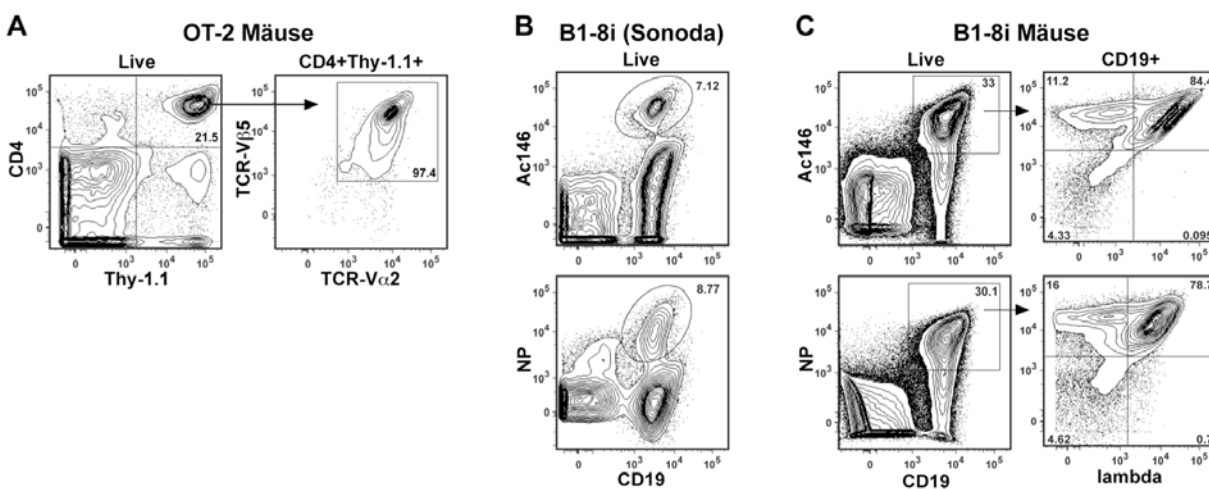


Abb. 11: Frequenz der transgenen Zellen der Donortiere

Gezeigt sind repräsentative Durchflusszytometrieanalysen transgener Donoren T- und B-Zellen, die aus Splenozytensuspensionen gewonnen wurden. In Abb. 11A ist die Frequenz aller transgenen CD4+Thy-1.1+ T-Zellen eines OT-2 Tieres dargestellt. Eine zusätzliche Spezifität der transgenen T-Zellen wurde über die Marker V α 2 und V β 5 gewährleistet. Die Abb. 11B und 11C zeigt eine Gegenüberstellung der Rajewski B1-8i Maus und unserer Bi-8i Maus (Kreuzung aus B1-8i, CkT und Ly-5.1 Mäuse) und deren Frequenz der transgenen B-Zellen. Die transgenen B-Zellen wurden in der Durchflusszytometrie mit dem Ac146 Antikörper und NP gegen den transgenen BZR markiert. Eine zusätzliche Gegenfärbung mit λ detektiert die Kombination der λ leichten Kette mit einer schweren Kette, wodurch der BZR erst NP erkennt.

3.2.2 Durchführung des adoptiven T-B Transfers

Beim adoptiven T-B Transfer wurden zusammen 2×10^6 CD62L^{high} sortierte, also naive OVA-Peptid spezifische T-Zellen mit $2,5 \times 10^6$ follikuläre, NP-spezifische B-Zellen i.v. in die Rezipientenmäuse transferiert. Da der Einfluss von ICOS auf die frühe T-B Kooperation untersucht werden sollte, wurden drei Analysegruppen eingeführt. In der ersten Gruppe exprimieren nur die transferierten OT-2 WT T-Zellen ICOS, die endogenen T-Zellen der ICOS KO Rezipienten tragen kein ICOS auf der Zelloberfläche. Beim Transfer von transgenen OT-2 ICOS KO T-Zellen in ICOS KO Rezipienten (Gruppe 2) dient das generelle Fehlen von ICOS zur Untersuchung möglicher Effekte. Eine weitere Gruppe mit normaler ICOS Expression auf transferierten T-Zellen und endogenen

T-Zellen, die zur Kontrolle des Systems dienen. Die Abb. 12 veranschaulicht nochmals die drei Analysegruppen mit ihren Donorzellen und Rezipiententieren.

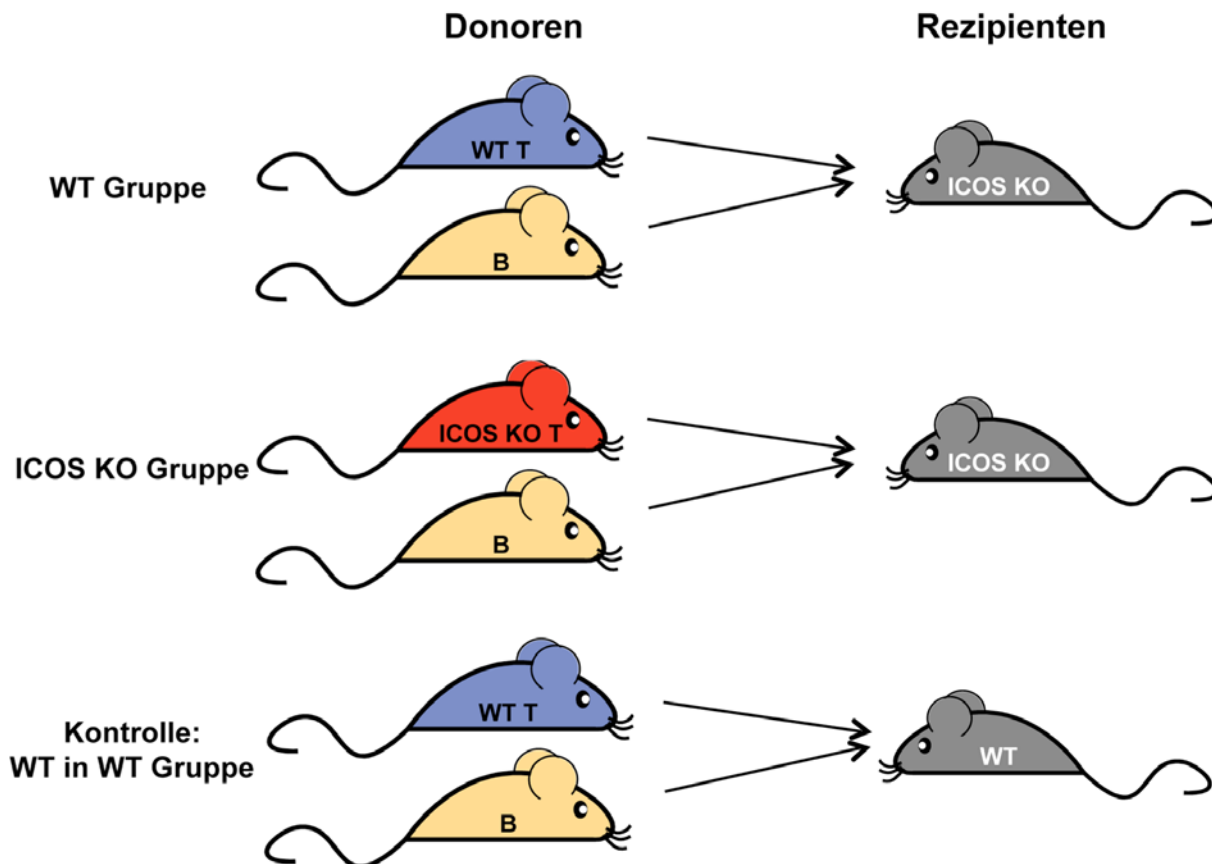


Abb. 12: Überblick der Analysegruppen des adoptiven T-B Transfers

Die Abbildung 12 zeigt die drei Analysegruppen zur Untersuchung der Rolle von ICOS bei der T-B Kooperation. Die Maussymbole in blau repräsentieren die transferierten OT-2 WT T-Zellen, die roten Maussymbole die transferierten OT-2 ICOS KO T-Zellen. Zusätzlich zu den transgenen T-Zellen wurden transgene B-Zellen von B1-8i Donoren transferiert, die in gelben Maussymbolen dargestellt sind. Als Rezipienten dienten entweder C57/B16 WT oder C57/B16 ICOS Mäuse.

3.2.3 Die Identifikation der transgenen Zellen im Rezipienten

Zur Detektion der adoptiv transferierten OVA-spezifischen T-Zellen in der Durchflusszytometrie benutzt man die Oberflächenmarker CD4 und Thy-1.1. In der Abb. 13 ist die Strategie zur Identifikation der transgenen und endogenen T-Zellen aufgezeigt. Eine positive Expression von CD4 und Thy-1.1 markiert somit eindeutig die transferierten T-Zellen. Die Analyse der endogenen T-Zellen (keine Thy-1.1 Expression) ist insoweit nützlich, da sie auch als Kontrolle für die Zellaktivierung dienen können.

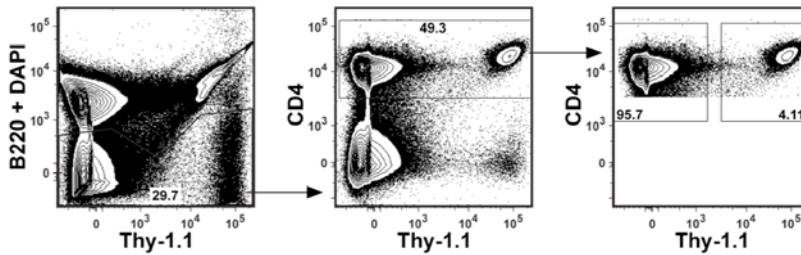


Abb. 13: Identifikationsstrategie der transgenen T-Zellen im Rezipienten

Lebende (DAPI negative) B220 negative CD4⁺ T-Zellen werden in eine Thy-1.1⁺ und Thy-1.1 negative Population unterteilt. Die B220-Thy-1.1⁺CD4⁺ T-Zellsubpopulation wird nochmals mit Hilfe des Markers Thy-1.1 in endogene T-Zellen (CD4⁺Thy-1.1⁻) und transgene T-Zellen (CD4⁺Thy-1.1⁺) eingeteilt.

Zur Identifizierung der transgenen B-Zellen im Rezipienten in der Durchflusszytometrie ist es generell möglich, den BZR mit klonotypischen Antikörpern wie Ac146 oder mit fluoreszenzmarkiertem Antigen (NP-APC = NP gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff APC) zu detektieren. Doch wie in Abb. 14 zu erkennen ist, verschlechtert sich nach der Immunisierung im Laufe der Aktivierung die Abtrennung zwischen den Ac146⁺ B-Zellen, also den transferierten B-Zellen und den endogenen B-Zellen. Bisher ist bekannt, dass bei einer Aktivierung der B-Zellen der BZR runterreguliert wird. Zusätzlich verschlechtert sich auch die Abtrennung für NP-APC. Daher kann vermutet werden, dass die Bindungsstelle des BZR für NP schon durch das gegebene NP-OVA besetzt ist. Diese Erkenntnisse führen dazu, dass die sichere Identifikation der transgenen B-Zellen im Rezipienten nicht mit dem Ac146 Antikörper oder NP-APC möglich ist. Daher wurden die B1-8i/CkT Mäuse mit Ly-5.1 Tieren gekreuzt. Dies ist ein C57BL/6 kongener Mausstamm, der sich nur durch eine Variante des Oberflächenmarkers CD45 unterscheidet.

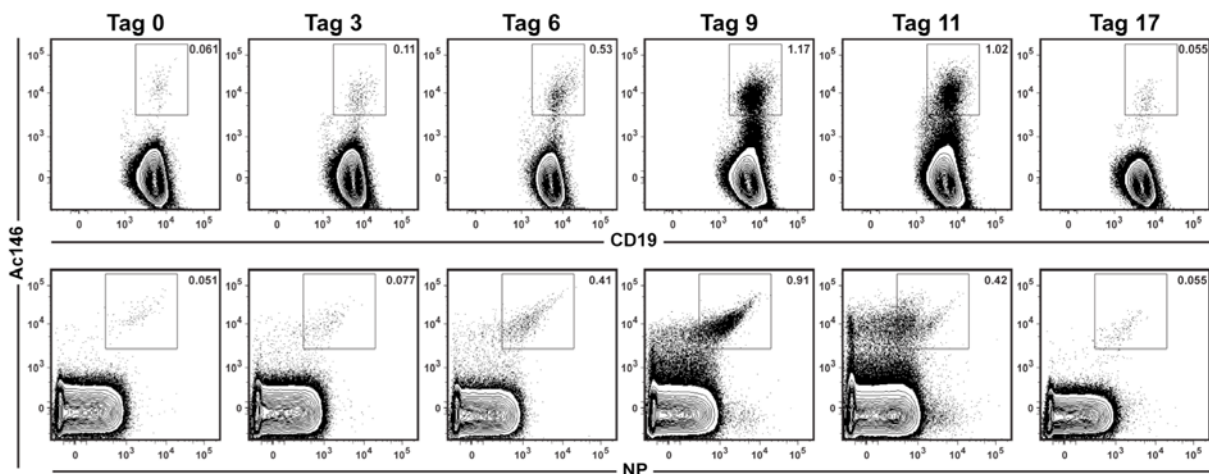


Abb. 14: Detektion der transgenen B-Zellen im Rezipienten

Gezeigt sind die Durchflusszytometrieanalysen eines adoptiven Transfers. Dabei wurden $2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen in WT Tiere transferiert und diese mit NP-OVA/Alum + B. pert. i.p. immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Milzen der Rezipienten auf die Frequenz der transferierten B-Zellen untersucht. Zur Detektion der transferierten B-Zellen wurden Ac146 und NP verwendet, die den transgenen BZR erkennen.

3. Ergebnisse

Die gewonnenen B1-8i Mäuse tragen nun auf der Zelloberfläche den Marker CD45.1, für den es spezifische Antikörper gibt. Zur eindeutigen Identifizierung der transgenen B-Zellen in der Durchflusszytometrie müsste eine positive Expression von CD19 und CD45.1 ausreichen, da endogene B-Zellen CD45.2 auf ihrer Zelloberfläche tragen und somit negativ für den Marker CD45.1 sind. Bei Testversuchen zum adoptiven Transfermodell hat sich aber gezeigt, dass auch hier die Abtrennung von CD45.1 positiven und CD45.1 negativen B-Zellen wegen einer CD45.1 intermediären Zellpopulation suboptimal ist und sich daher die Abtrennung von endogenen und transgenen B-Zellen schwierig gestaltet. Um dieses Problem zu umgehen dient bei der durchflusszytometrischen Analyse eine zusätzliche Detektion mit Hilfe eines CD45.2 Antikörpers, wodurch die transgenen B-Zellen exakt identifiziert werden können. Die transgenen B-Zellen sind über eine CD19+CD45.1+CD45.2- (bzw. B220+CD45.1+CD45.2-) Expression eindeutig von den endogenen B-Zellen (CD19+CD45.1-CD45.2+) zu unterscheiden. Die Abb. 15 veranschaulicht, warum der zusätzliche CD45.2 Antikörper zur genaueren Identifikation transgener B-Zellen essentiell ist. In frühen und sehr späten Kinetikzeitpunkten beim adoptiven T-B Transfer liegt die Frequenz der transferierten transgenen B-Zellen im Rezipienten bei unter 1% (siehe Tag 0, Tag 2, Tag 9 und Tag 13). Die Zellfrequenz der B-Zellen, die unspezifisch CD45.1 und CD45.2 binden, beträgt an den genannten Analysetagen ebenfalls unter 1%. Verzichtet man aber auf den CD45.2 Marker und definiert die transgenen B-Zellen nur über eine positive CD45.1 Expression, so sind die Hälfte der angeblich transgenen B-Zellen endogene B-Zellen, die fälschlicherweise CD45.1 gebunden haben.

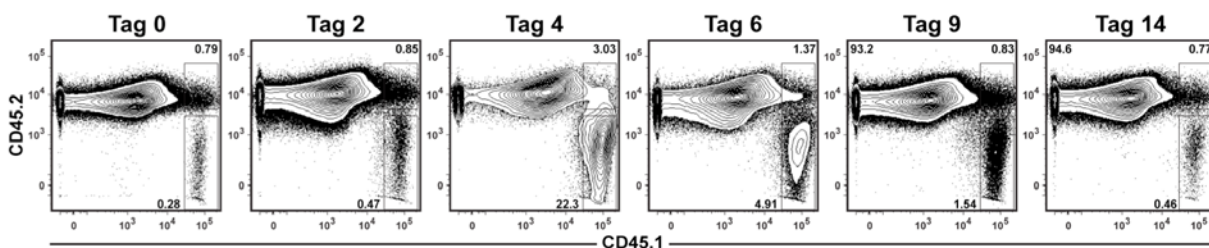


Abb. 15: Identifikationsstrategie der transgenen B-Zellen im Rezipienten

Gezeigt sind die Durchflusszytometrieanalysen eines adoptiven Transfers, wobei $2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen in WT Tiere transferiert und diese mit NP-OVA/Alum + B. pert. an der Schwanzbasis immunisiert wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die drainierenden Lymphknoten der Rezipienten auf die Frequenz der transferierten B-Zellen untersucht. Zur Detektion der transferierten B-Zellen wurden die Antikörper CD45.1 und CD45.2 verwendet. Die Live B Lineage negativen CD19+ B-Zellen werden mit Hilfe der Marker CD45.1 und CD45.2 in endogene B-Zellen (CD45.1-CD45.2+) und transgene B-Zellen (CD45.1+CD45.2-) eingeteilt. B-Zellen, die sowohl CD45.1 und CD45.2 exprimieren, sind von der Analyse auszuschließen.

Deshalb ist es absolut essentiell, transgene B-Zellen mit Hilfe von CD45.1 und CD45.2 eindeutig zu definieren. Zusätzlich kann auch hier die Analyse der endogenen B-Zellen als Kontrolle für die Zellaktivierung dienen. Die Detektion der transgenen B-Zellen durch CD45.1 und CD45.2 wurde

mit einer CFSE-Markierung der transgenen B-Zellen nochmals kontrolliert. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass eine CD45.1+CD45.2- Expression der B-Zellen mit dem CFSE-Signal übereinstimmt (Daten nicht gezeigt). Die Abb. 16 gibt noch mal einen Überblick der verwendeten Antikörpern, um die transferierten T- und B-Zellen von den endogenen Zellen der Rezipienten zu unterscheiden.

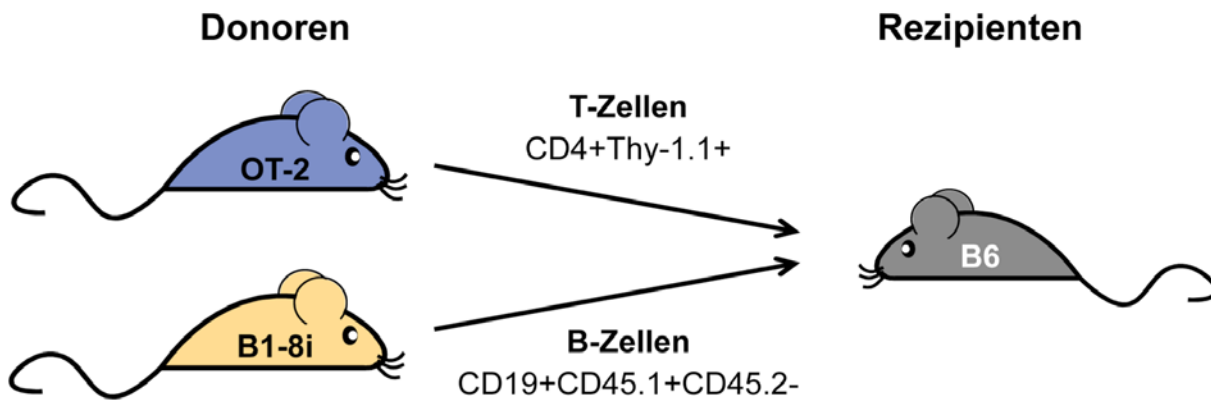


Abb. 16: Verwendete Antigene zur Unterscheidung endogener und transgener Zellen

3.2.4 T-Zellabhängigkeit des etablierten adoptiven T-B Transfermodells

Ein weiterer wichtiger Punkt zur erfolgreichen Etablierung des T-B Transfermodells ist die optimale Bedingung der Stimulation der T-Zellen zur Aktivierung der B-Zellen. Für diese Untersuchungen wurden den Rezipienten nur CFSE-markierte, transgene B-Zellen oder ein Zellgemisch mit transgenen CFSE-markierten B-Zellen und T-Zellen in steigender Zellzahl appliziert und mit NP-OVA/Alum + B. pert. immunisiert. Vier Tage nach der Immunisierung wurde die Expansion, die Proliferation und der Aktivierungsstatus der transgenen B-Zellen in Abhängigkeit der transgenen T-Zellzahl im drainierenden Lymphknoten analysiert. Auffällig erkennbar ist, dass die Expansion der transgenen B-Zellen deutlich mit der Anzahl der mittransferierten transgenen T-Zellen ansteigt (Abb. 17A). Der gleiche Effekt ist auch für die Proliferation, die mit Hilfe der Abnahme des CFSE-Signals gemessen wurde, der transgenen B-Zellen zu erkennen. So nimmt die Anzahl der B-Zellteilungszyklen mit der Anzahl der transferierten T-Zellen zu (Abb. 17B). Die schlechte Abtrennung der CFSE-markierten B-Zellen könnte daran liegen, dass B-Zellen unterschiedlicher Subtypen CFSE unterschiedlich stark aufnehmen (Daten nicht gezeigt). Da eine Abtrennung der einzelnen Proliferationsstufen nicht so einfach zu erkennen ist als bei T-Zellen, wurde zur Einteilung der unterschiedlichen Proliferationsstufen der B-Zellen an Hand ihrer CFSE-Helligkeit in drei Gruppen eingeführt (siehe auch Abschnitt 2.5.1). Weiterhin lässt sich eine Proportionalität zwischen der Anzahl der transferierten T-Zellen und der Expression von IgD, IgM und GL7 zeigen. Mit steigender T-Zellzahl werden B-Zellen stärker aktiviert, was in einer Runterregulation von IgD,

3. Ergebnisse

dem zusätzlichen Verlust von IgM und einer deutlichen Hochregulation von GL7 sichtbar wird (Abb. 17C und Abb. 17D).

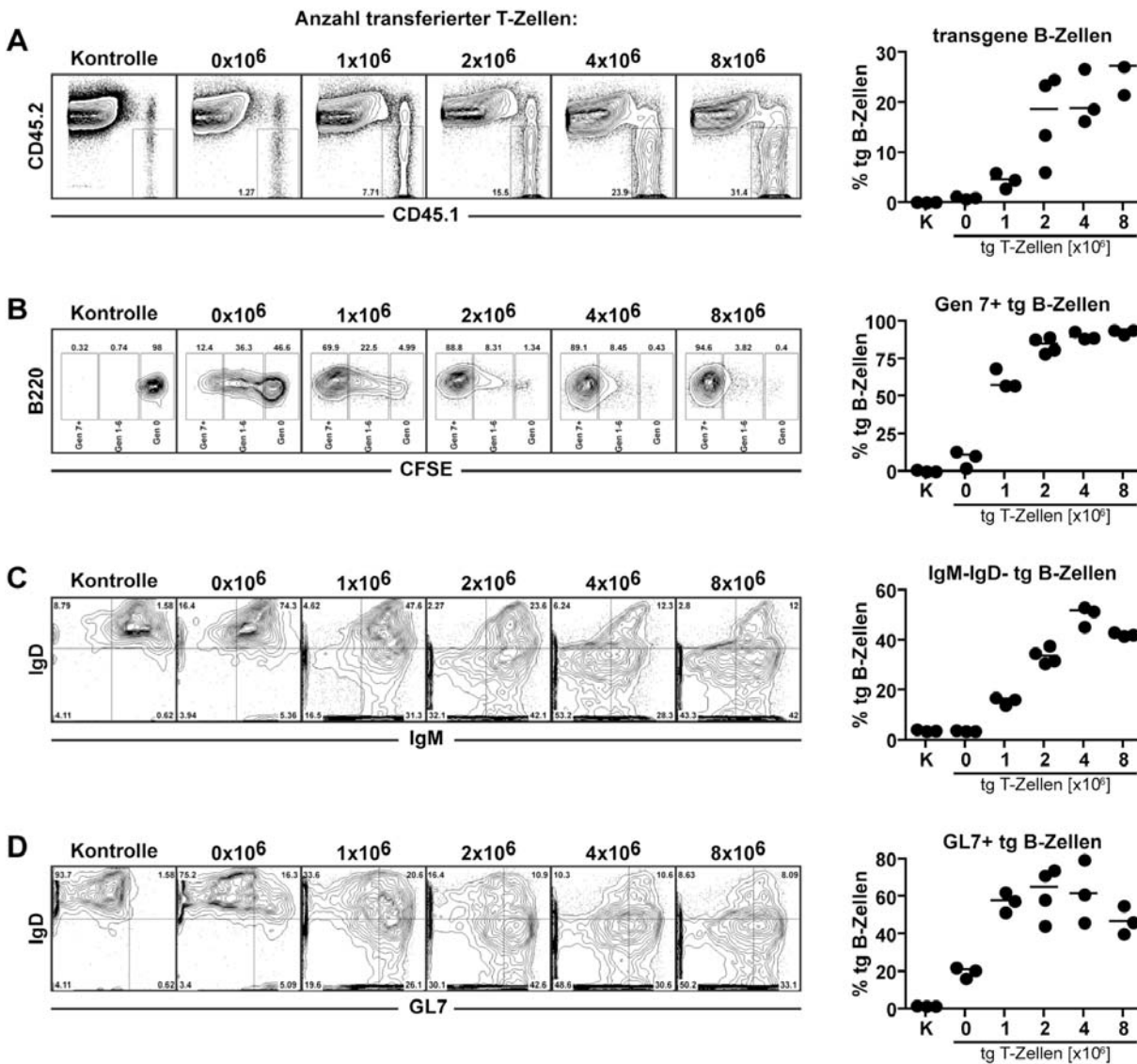


Abb. 17: T-Zellabhängigkeit des adoptiven T-B Kooperationsmodells

Dargestellt sind repräsentative Durchflusszytometrieanalysen und deren graphische Auswertungen eines adoptiven Transfers. Dabei wurden $2,5 \times 10^6$ transgene, CFSE-markierte B-Zellen und naive transgene OT-2 WT T-Zellen in unterschiedlichen Mengen in C57BL/6 Tiere transferiert und diese mit NP-OVA/Alum + B. pert. an der Schwanzbasis immunisiert. Vier Tage nach Immunisierung wurden die drainierenden Lymphknoten der Rezipienten auf die Frequenz der transferierten B-Zellen untersucht (A). Die Proliferation der transgenen B-Zellen wurde mit Hilfe der CFSE-Intensität gemessen (B). Der Ig-Klassenwechsel wurde durch die Expression von IgM und IgD analysiert (C). Die Entstehung von Keimzentren wurde durch eine positive GL7 Expression identifiziert (D).

Damit wurde gezeigt, dass eine Abhängigkeit zwischen der T-Zellhilfe und des Ig-Klassenwechsel und der Keimzentrumsreaktion im adoptiven T-B Kooperationsmodell besteht. Diese Ergebnisse dienen auch zur Entscheidung, wie viele transgene T-Zellen man im adoptiven T-B Transfermodell verwendet. Es scheint, dass die stärksten B-Zelleffekte mit einem Kotransfer von 4×10^6 transgenen T-Zellen erreicht werden, mit einer weiteren Zunahme der T-Zellzahl tritt eine Sättigung der

B-Zelleffekte ein. Mit einem Kotransfer von jedoch 2×10^6 transgenen T-Zellen erreicht man gewünschte T-Zell-abhängige B-Zelleffekte ohne das System durch eine zu hohe Anzahl an transgenen B-Zellen zu überlasten.

3.2.5 Lokalisierung der transgenen Zellen in den Rezipienten

Im nächsten Schritt soll die Verteilung der transferierten Zellen auf verschiedene Organe im Rezipienten nach einer Immunisierung untersucht werden. Damit soll u. a. geklärt werden, ob die Immunisierung der Rezipienten am Schwanzansatz zu einer lokalen oder systemischen Immunantwort führt. Zusätzlich soll untersucht werden, ob eine ICOS-Defizienz einen Einfluss auf die Lokalisierung der transferierten Zellen hat. Dafür wurden drei Transfergruppen (Abb. 12) gewählt: transgene OT-2 WT T-Zellen mit transgenen B-Zellen in WT Mäuse, transgene OT-2 WT T-Zellen mit transgenen B-Zellen in ICOS KO Tiere und transgene OT-2 ICOS KO T-Zellen mit transgenen B-Zellen in ICOS Mäuse (Abb. 18). 24 Stunden nach dem Transfer hatten sich die T- und B-Zellen in allen 3 Gruppen gleichmäßig in Milz, Blut und Lymphknoten verteilt (Daten nicht gezeigt). Vier bzw. zehn Tagen nach der Immunisierung wurde die zelluläre Lokalisierung der transgenen T- und B-Zellen in drainierenden Lymphknoten, nicht drainierenden Lymphknoten, Milz, Knochenmark und Blut der Rezipienten in der Durchflusszytometrie untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass man die transferierten Zellen in den fünf Organen aller drei Rezipientengruppen detektieren kann, was auf eine gleichmäßige Zellverteilung der transgenen Zellen schließen lässt. Zum vierten Analysetag ist die Expansion der transgenen T-Zellen im drainierenden Lymphknoten am stärksten. Diese erreicht zum 10. Analysetag wieder den Ausgangswert. Weiterhin lässt sich auch eine signifikante Expansion der transgenen T-Zellen im Blut, in nicht drainierenden Lymphknoten und in der Milz an Tag 4 zeigen. Auch in diesen Organen verringert sich die Frequenz der transgenen T-Zellen bis an Tag 10 auf die Startfrequenz. Daher kann vermutet werden, dass die transgenen T-Zellen schon nach vier Tagen den drainierenden Lymphknoten verlassen und über das Blut in andere sekundär lymphatische Organe einwandern. Das Einwandern ins Knochenmark und das Verbleiben der transgenen T-Zellen dort konnte an den vorgenommenen Analysetagen nicht beobachtet werden.

Die Expansion der transgenen B-Zellen ist im drainierenden Lymphknoten ebenfalls am stärksten und auch hier erreicht diese zum 10. Analysetag wieder die Startfrequenz. Einen leichten Anstieg der Zellfrequenz der transgenen B-Zellen ist im nicht drainierenden Lymphknoten und in der Milz an Tag 4 zu beobachten, jedoch nicht im Blut oder im Knochenmark. Dies zeigt, dass B-Zellen später als T-Zellen den drainierenden Lymphknoten verlassen und über das Blut in andere sekundär

lymphatische Organe einwandern. Das Einwandern ins Knochenmark und das Verbleiben der transgenen B-Zellen konnte ebenfalls an den vorgenommenen Analysetagen nicht gezeigt werden. Auffällig ist, dass eine ICOS-Defizienz der transferierten T-Zellen sich auf die maximale Zellexpansion der T- und B-Zellen auswirkt, die endogene Expression von ICOS hat darauf nur einen geringen Einfluss (Vergleich OT-2 WT T-Zellen in WT Rezipienten mit OT-2 WT T-Zellen in ICOS KO Rezipienten).

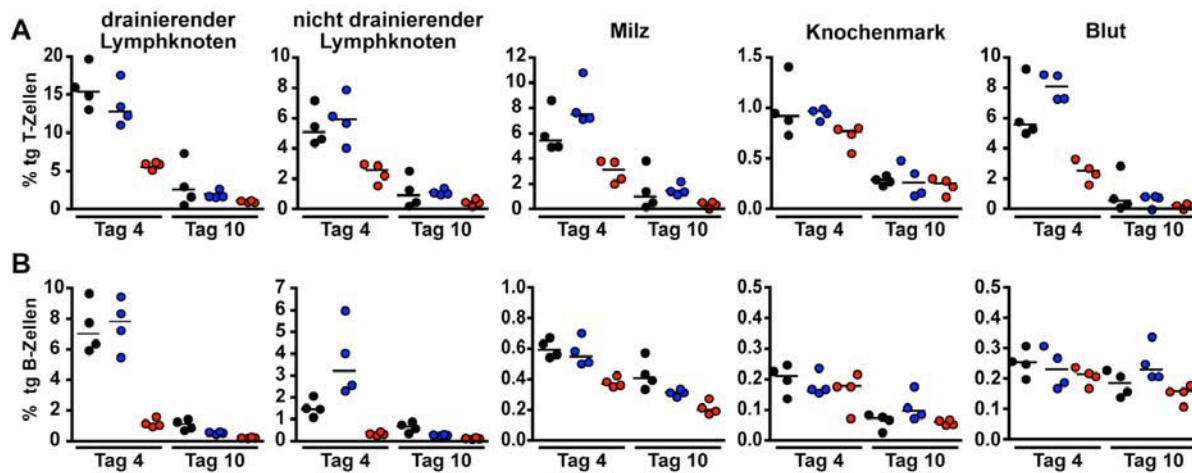


Abb. 18: Lokalisierung der transgenen Zellen in verschiedenen Rezipientenorganen

Diese Abbildung zeigt die Lokalisierung der transferierten Zellen in den verschiedenen Rezipientenorganen. Dabei wurden $2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen und 2×10^6 naive transgene OT-2 WT T-Zellen oder OT-2 ICOS KO T-Zellen in WT oder ICOS KO Tiere transferiert und diese mit NP-OVA/Alum + B. pert. an der Schwanzbasis immunisiert. Vier und 10 Tagen nach Immunisierung wurden die drainierenden Lymphknoten in der Durchflusszytometrie analysiert. Schwarze Symbole repräsentieren die Kontrollgruppe (OT-2 WT T-Zellen mit B-Zellen in WT), die blauen Symbole zeigen die Tiere der 1. Transfergruppe (OT-2 WT T-Zellen mit B-Zellen in ICOS KO) und roten Symbole stehen für Tiere der 2. Transfergruppe (OT-2 ICOS KO T-Zellen mit B-Zellen in ICOS KO).

Es kann festgehalten werden, dass die Art der Immunisierung zur einer lokalen Immunreaktion führt, da die Expansion der transferierten Zellen im drainierenden Lymphknoten am stärksten ist. Es ist bekannt, dass aktivierte Zellen das drainierende Gewebe verlassen und in andere lymphatische Geweben einwandern. Daher ist die Detektion der transgenen Zellen in Blut, nicht drainierenden Lymphknoten, Milz und Knochenmark nicht verwunderlich. Weiterhin hat die fehlende Expression von ICOS auf endogene und transgenen T-Zellen keinen Einfluss auf die Zellverteilung der transferierten T- und B-Zellen in den Rezipienten. Auffällig ist, dass eine ICOS-Defizienz bei transferierten, transgenen T-Zellen eine signifikante Wirkung auf die Expansion der transgenen T- und B-Zellen hat. Weitere Untersuchungen sollten dieses Phänomen aufklären.

3.3 Die Rolle von ICOS im *in vivo* T-B Kooperationsmodell

3.3.1 Der Einfluss von ICOS auf die Expansion der transferierten Zellen

Wie bereits gezeigt, führt das Fehlen von ICOS auf den transferierten, transgenen T-Zellen zu einer geringeren Expansion der transgenen T- und B-Zellen. Genauere Untersuchungen an dicht aufeinander folgenden Analysetagen sollten klären, ob eine ICOS-Defizienz generell zu einer verringerten Expansion der transferierten T- und B-Zellen führt oder ob die Expansionskinetik verlangsamt ist und das Expansionsmaximum zu einem späteren Zeitpunkt auftritt. Daher wurden transgene OT-2 WT T-Zellen mit transgenen B-Zellen in ICOS KO Rezipienten und OT-2 ICOS KO T-Zellen mit transgenen B-Zellen in ICOS KO Rezipienten transferiert. Nach der Immunisierung wurden die drainierenden Lymphknoten der Rezipienten in der Durchflusszytometrie auf die Frequenz der transferierten Zellen untersucht.

Die Frequenz der transgenen T-Zellen erreicht drei Tage nach der Immunisierung ihr Maximum, wobei die transgenen OT-2 WT T-Zellen stärker expandierten als die OT-2 ICOS KO T-Zellen (18% im Vergleich zu 11%). Berechnet man die absolute Zellzahl der transgenen T-Zellen, so befinden sich rund $4,4 \times 10^6$ WT T-Zellen im Vergleich zu $2,9 \times 10^6$ ICOS KO T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten. Jedoch sinkt die Frequenz der T-Zellen sehr schnell wieder ab und erreicht nach etwa zehn Tagen wieder die Startfrequenz. Es scheint, dass die Frequenz der transgenen ICOS KO T-Zellen nicht so schnell abnimmt wie die Frequenz der WT T-Zellen. Dieses Kinetikmuster ist auch quantitativ zu beobachten (Abb. 19A).

Die maximale Expansion der transgenen B-Zellen wird vier Tage nach Immunisierung erreicht. In Anwesenheit von transgenen WT T-Zellen expandieren die spezifischen B-Zellen sechsmal stärker als in der ICOS KO Situation (13% im Vergleich zu 2,5%). Dies entspricht, in absoluten Zellzahlen berechnet, in Anwesenheit von WT T-Zellen rund 6×10^6 transgenen B-Zellen gegenüber 1×10^6 transgenen B-Zellen mit ICOS KO T-Zellen. Bereits sechs Tage nach Immunisierung erreicht die B-Zellfrequenz der ICOS KO Gruppe die Startfrequenz. Die Frequenz der transgenen B-Zellen in der WT Situation sinkt erst nach zehn Tagen auf die Ausgangsfrequenz ab. Dieses Kinetikmuster ist ebenfalls quantitativ zu beobachten (Abb. 19B).

3. Ergebnisse

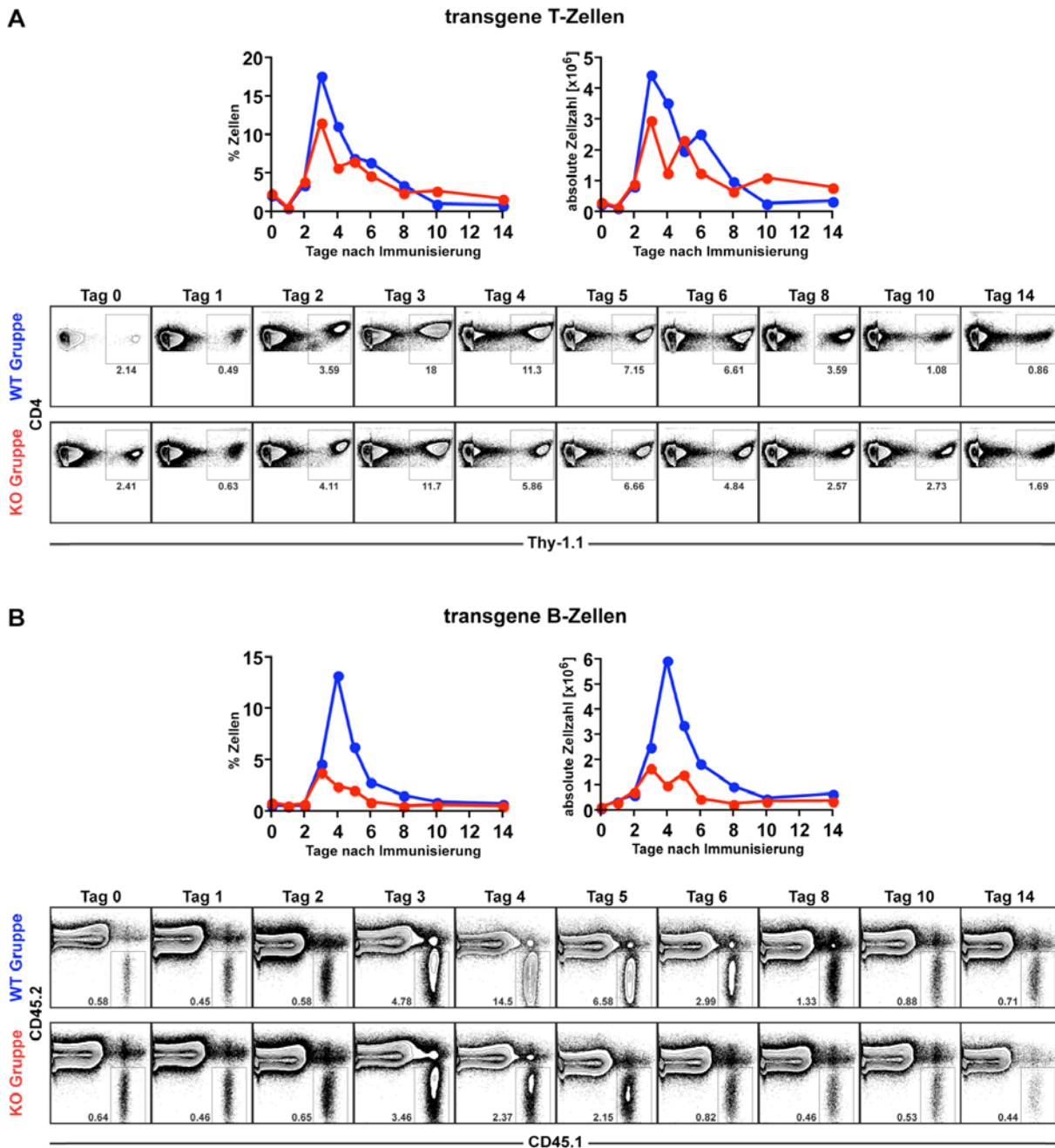


Abb. 19: Expansionskinetik transgener Zellen im adoptiven T-B Transfermodell

Gezeigt sind repräsentative Durchflusszytometrieanalysen und deren graphische Auswertungen der T- (A) und B-Zellexpansion (B) im drainierenden Lymphknoten über die Zeit im adoptiven T-B Transfermodell. Dafür wurden $2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen und 2×10^6 naive transgene OT-2 WT T-Zellen oder OT-2 ICOS KO T-Zellen in ICOS KO Tiere transferiert und diese mit NP-OVA/Alum + B. pert. an der Schwanzbasis immunisiert. Bei jedem Analysetag wurden die drainierenden Lymphknoten von jeweils vier Rezipienten gepoolt und in der Durchflusszytometrie untersucht. Die Anzahl der transgenen T- und B-Zellen ist quantitativ mit der Zellfrequenz und qualitativ in absoluter Zellzahl angegeben. Blaue Symbole in den Graphiken repräsentieren die detektierten, transgenen Zellen der 1. Transfergruppe (OT-2 WT T-Zellen mit B-Zellen in ICOS KO Mäuse) in den Rezipienten. Die analysierten T- und B-Zellen der 2. Transfergruppe (OT-2 ICOS KO T-Zellen mit B-Zellen in ICOS KO Mäusen) sind mit roten Symbolen gezeigt. Gezeigt sind Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. Mehrfach unabhängig durchgeführte Untersuchungen führten zu gleichen Ergebnissen.

Die transferierten T- und B-Zellen lassen sich auch in der Immunhistologie detektieren. Auch hier erkennt man den Einfluss von ICOS, exprimiert auf den transgenen T-Zellen, vor allem bei der

Expansion der transgenen B-Zellen. Weiterhin lässt sich beobachten, dass die transferierten T-Zellen vorwiegend in der T-Zellzone der drainierenden Lymphknoten lokalisiert sind. Einige der transgenen T-Zellen sitzen am Rand der B-Zellzone bzw. wandern weiter in die FDC-Region der B-Zellfollikel ein, wo sie für die B-Zellen die T-Zellhilfe leisten. Auffällig ist, dass in der WT Gruppe mehr transgene T-Zellen in das B-Zellareal einwandern als in der ICOS KO Gruppe (Abb. 20A). Daher kann man vermuten, dass die geringere Expansion der B-Zellen in der 2. Transfergruppe durch die verringerte T-Zellhilfe im B-Zellfollikel zustande kommt. Die transferierten B-Zellen befinden sich zum großen Teil in der B-Zellzone der drainierenden Lymphknoten und konzentrieren sich im B-Zellfollikel. Ein geringerer Teil der transgenen B-Zellen ist auch am Rand zur und in der T-Zellzone lokalisiert. Es scheint jedoch, dass ICOS keinen Einfluss auf die Lokalisierung der B-Zellen in der T-Zellzone hat (Abb. 20B).

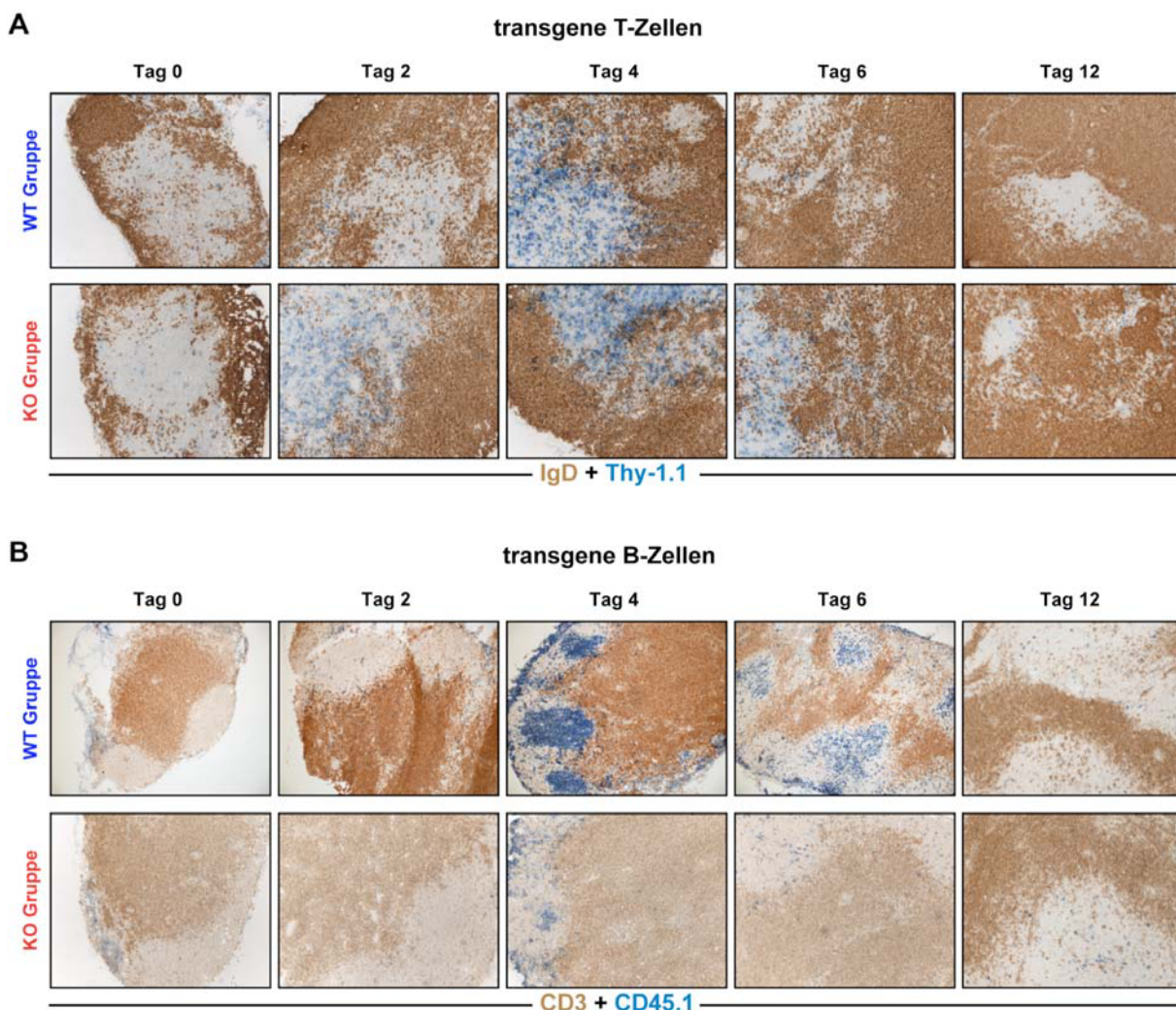


Abb. 20: Lokalisierung transgener T- und B-Zellen in der Histologie

Mit Hilfe der Immunhistologie wurde die T- und B-Zelllokalisierung und deren Expansion im adoptiven T-B Transfermodell untersucht. Dafür wurden $2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen und 2×10^6 naive transgene OT-2 WT T-Zellen oder OT-2 ICOS KO T-Zellen in ICOS KO Tiere transferiert und diese mit NP-OVA/Alum + B. pert. an der Schwanzbasis immunisiert. An den gezeigten Analysetagen wurden von den drainierenden Lymphknoten der Rezipienten Kryoschnitte gefertigt. Die transferierten T- (A) bzw. B-Zellen (B) wurden in der Immunhistologie mit

Hilfe von Thy-1.1 bzw. CD45.1 (blau) detektiert. Zur Charakterisierung der Lymphknotenarchitektur wurden die B-Zellareale mit IgD (braun) bzw. die T-Zellareale mit CD3 (braun) gegen gefärbt.

3.3.2 Die ICOS-Defizienz führt zur verringerten Proliferation transferierter B-Zellen im adoptiven T-B Kooperationsmodell

In den nächsten Analysen soll die Ursache der dramatischen Differenz der B-Zellexpansion in der WT Gruppe im Vergleich zur ICOS KO Gruppe geklärt werden. Die erhöhte B-Zellfrequenz der 1. Transfergruppe könnte durch verstärkte Proliferation oder verringertes Absterben der transgenen B-Zellen in den drainierenden Lymphknoten erklärt werden. Dafür wurden transgene B-Zellen mit CFSE markiert und mit transgenen OT-2 WT T-Zellen oder OT-2 ICOS KO T-Zellen zusammen in ICOS KO Rezipienten transferiert. Am nächsten Tag folgte die Immunisierung mit NP-OVA/Alum + B. pert. Zusätzlich wurden an den Analysezeitpunkten die Rezipienten zwei Stunden vor der Analyse mit BrdU behandelt. Danach wurden in Einzeltieranalysen die Expansion der transgenen B-Zellen in den drainierenden Rezipientenlymphknoten in der Durchflusszytometrie untersucht. Abermals konnte eine dramatische B-Zellexpansion in der WT Gruppe an Tag 4 nach Immunisierung gemessen werden (Abb. 21A).

Die Analyse des CFSE-Signals zeigt einen signifikanten Unterschied in der B-Zellproliferation zwischen den beiden Gruppen zu diesem Zeitpunkt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei Anwesenheit von ICOS das CFSE-Signal stark abnimmt und somit mehr B-Zellen schon mehrere Zellzyklusteilungen an Tag 4 durchgeführt haben (90% der transgenen B-Zellen durchliefen sieben oder mehr Zellzyklen). Exprimieren transgenen T-Zellen kein ICOS auf ihrer Zelloberfläche, so zeigen transgene B-Zellen im T-B Transfermodell vier Tage nach Immunisierung, ein helleres CFSE-Signal, also eine verringerte Proliferation der B-Zellen, was sich in einer erhöhten Frequenz der Generation 0 äußert (nur ca. 72% der B-Zellen der ICOS KO Gruppe befinden sich in der Generation 7+) (Abb. 21B).

Auch die Frequenz der transgenen B-Zellen, die BrdU eingebaut haben (BrdU-Einbau als Marker für die Zellproliferation), ist in der WT Gruppe stark erhöht. Dies ist schon 60 h nach einer Immunisierung zu erkennen, wobei ca. 6% der transgenen B-Zellen der WT Gruppe BrdU eingebaut haben. Zu diesem Zeitpunkt sind hingegen nur etwa 3% der transgenen B-Zellen der ICOS KO Gruppe positiv für BrdU. Vier Tage nach Immunisierung haben die transgenen B-Zellen der WT Gruppe dreimal mehr BrdU eingebaut (ca. 11%) als die transgenen B-Zellen der ICOS KO Gruppe (etwa 4%). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die stärkste Proliferation der B-Zellen in den letzten Zellzyklusteilungen geschieht (Abb. 21C).

Ob die signifikante Differenz der B-Zellexpansion vielleicht auch durch eine verstärkte Apoptosereaktion in der ICOS KO Gruppe zustande kommt, wurde mit zwei unabhängigen Messmethoden untersucht. So zeigt sich in der Durchflusszytometrie eine ähnlich erhöhte Annexin-V Expression auf transgenen B-Zellen beider Transfergruppe 60 h bzw. 4 Tage nach Immunisierung. Mit der zweiten Methode zur Apoptosebestimmung, der Färbung aktiver Caspasen mit dem FLICA Reagenz, konnte sogar eine erhöhte Caspaseaktivität bei den transgenen B-Zellen in der WT Gruppe an Tag 6 gemessen werden, wobei die Zellfrequenzen mit ca. 5,5% (bzw. 1,7% bei ICOS KO Gruppe) eher gering ausfielen.

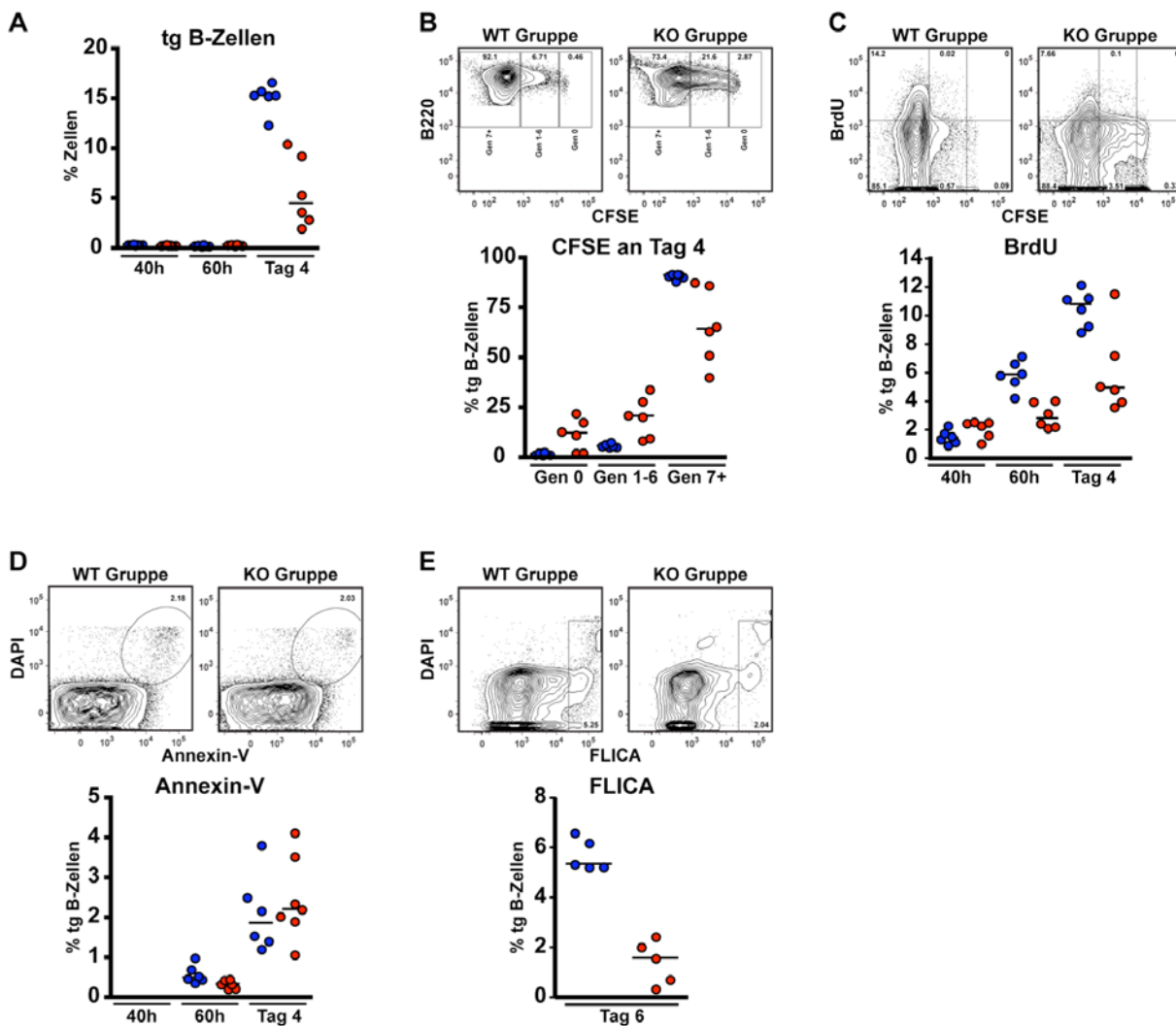


Abb. 21: Der Einfluss von ICOS auf die B-Zellproliferation und Apoptose

Gezeigt sind repräsentative Durchflusszytometrieanalysen und deren statistischen Analysen der transgenen B-Zellen im adoptiven T-B Transfermodell. Es wurden $2,5 \times 10^6$ CFSE-markierte, transgene B-Zellen und 2×10^6 naive transgene OT-2 WT T-Zellen oder OT-2 ICOS KO T-Zellen in ICOS KO Tiere transferiert und diese mit NP-OVA/Alum + B. pert. an der Schwanzbasis immunisiert. Zwei Stunden vor Analyse wurden die Rezipienten mit BrdU i.v. behandelt. Jedes blaue Symbol zeigt ein Tier der 1. Transfergruppe (OT-2 WT T-Zellen mit B-Zellen in ICOS KO), die roten Symbole repräsentieren Tiere der 2. Transfergruppe (OT-2 ICOS KO T-Zellen mit B-Zellen in ICOS KO). Mehrfach unabhängig durchgeführte Untersuchungen führten zu gleichen Ergebnissen.

Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die erhöhte B-Zellexpansion der WT Gruppe durch erhöhte B-Zellproliferation und nicht durch eine verstärkte Apoptosereaktion auf Seiten der B-Zellen der KO Gruppe zu erklären ist. Es scheint also, dass die Expression von ICOS auf den transgenen T-Zellen essentiell ist für eine ausreichende Aktivierung der spezifischen B-Zellen, die dann zur Proliferation führt. In den nächsten Schritten sollte die Expression diverser Aktivierungsmarker der transgenen B-Zellen im adoptiven T-B Transfermodell untersucht werden. Man versprach sich mit diesen Untersuchungen, den Einfluss von ICOS auf die B-Zellaktivierung und B-Zelldifferenzierung in den frühen Phasen der Immunantwort weiter aufzuklären.

3.3.3 Der Einfluss von ICOS auf die Regulation verschiedener Aktivierungsmarker im adoptiven T-B Transfer

Bisher wurde gezeigt, dass die Expression von ICOS auf transgenen T-Zellen essentiell ist für eine ausreichende Aktivierung der spezifischen B-Zellen. Dies wurde mit Proliferationsstudien transgener B-Zellen im adoptiven T-B Transfermodell belegt. In wieweit sich die Expression von ICOS auf den Aktivierungs- und Differenzierungsstatus der transgenen B-Zellen auswirkt, wurden in den folgenden Experimenten untersucht. Dafür wurden transgene B-Zellen mit transgenen OT-2 WT T-Zellen oder OT-2 ICOS KO T-Zellen in ICOS KO Rezipienten transferiert und mit NP-OVA/Alum + B. pert. immunisiert. Danach wurden die drainierenden Lymphknoten in der Durchflusszytometrie auf den Aktivierungsstatus der transgenen Zellen hin analysiert. Die Tab. 5 und Tab. 6 zeigen zusammengefasst die Expression der untersuchten Oberflächenantigene auf transferierten T- und B-Zellen.

Epitop	Funktion bei T-Zellen	Regulation	Beschreibung der Regulation
CD25	Aktivierung, Proliferation	+	Expression vergleichbar
CD62L	Adhäsion, Migration	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
CD69	Aktivierung	+	Expression vergleichbar
PD-1	Kostimulation	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
BTLA	Kostimulation	+	Expression vergleichbar
HVEM	Kostimulation	+	Expression vergleichbar

Tab. 5: Analytierte Aktivierungsmarker der transferierten T-Zellen

Aufgelistet sind die in der Durchflusszytometrie gemessenen Oberflächenantigene transferierter T-Zellen und deren Funktion. Weiterhin ist zusammengefasst, ob die Oberflächenmarker auf aktivierten T-Zellen spezifisch reguliert werden (Regulation) und welchen Einfluss ICOS auf die Expression der gemessenen Oberflächenmarker (Beschreibung der Regulation) hat.

Epitop	Funktion bei B-Zellen	Regulation	Beschreibung der Regulation
CD21	Aktivierung	+	Expression vergleichbar
CD23	Aktivierung	+	Stärkere Expression bei KO Gruppe
CD24	B-Zelldifferenzierung, Proliferation	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
CD25	Aktivierung, Proliferation	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
CD27	Proliferation, Kostimulation	-	Kein Effekt
CD30	Proliferation, Apoptose	-	Kein Effekt
CD38	Aktivierung	+	Stärkere Expression bei KO Gruppe
CD43	Adhäsion, Migration, Überleben	+	Stärkere Expression bei KO Gruppe
CD44	Adhäsion, Migration	+	Kein Effekt
CD54	Aktivierung	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
CD62L	Adhäsion, Migration	+	Stärkere Expression bei KO Gruppe
CD69	Aktivierung	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
CD70	Kostimulation	-	Kein Effekt
CD80	Proliferation, Kostimulation	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
CD86	Proliferation, Kostimulation	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
CD95	Apoptose, Marker für GC B-Zellen	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
CD103	Adhäsion, Migration	-	Kein Effekt
IL-7R	B-Zelldifferenzierung, Aktivierung	+	Expression vergleichbar
4-1BBL	Kostimulation	-	Kein Effekt
CXCR3	Migration	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
CXCR4	Migration	+	Expression vergleichbar
CXCR5	Migration	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
TACI	Inhibition der Proliferation	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
BAFF-R	B-Zellüberleben, Kostimulation	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
BTLA	negative Regulation	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
PD-L2	Kostimulation	-	Kein Effekt
PD-L1	Kostimulation	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
ICOS-L	Kostimulation	+	Stärkere Expression bei KO Gruppe
PD-1	Kostimulation	+	Expression vergleichbar
HVEM	Aktivierung	+	Stärkere Expression bei KO Gruppe
Ac146	NP spezifischer BZR	+	Stärkere Expression bei KO Gruppe
NP	NP spezifischer BZR	+	Stärkere Expression bei KO Gruppe
IgM+IgD+	Marker für reife, naive B-Zellen	+	Stärkere Expression bei KO Gruppe
IgM+IgD-	Marker für aktivierte B-Zellen	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
IgM-IgD-	Marker für klassengewechselte B-Zellen	+	Stärkere Expression bei WT Gruppe
MHC-II	B-Zellrezeptor	+	Stärkere Expression bei KO Gruppe

Tab. 6: Analytierte Aktivierungsmarker der transferierten B-Zellen

Aufgelistet sind die in der Durchflusszytometrie gemessenen Oberflächenantigene transferierter B-Zellen und deren Funktion. Weiterhin ist zusammengefasst, ob die transferierten B-Zellen durch Immunisierung aktiviert werden (Regulation) und welchen Einfluss ICOS auf die Expression der gemessenen Oberflächenmarker (Beschreibung der Regulation) hat.

3.3.3.1 Aktivierungsstatus transferierter T-Zellen im adoptiven T-B Transfermodell

Zu den früh exprimierten Oberflächenmarkern der T-Zellen gehören CD25 und CD69. Diese Marker erreichen schon nach 24 h nach Immunisierung ihr Expressionsmaximum und definieren aktivierte T-Zellen. Sowohl OT-2 WT und OT-2 ICOS KO T-Zellen exprimieren zu 95% CD69 und zu 92% CD25. Dies bedeutet, dass alle transferierten T-Zellen durch eine Antigengabe aktiviert werden. Es scheint jedoch, dass ICOS auf die Expression von CD25 und CD69 keinen Einfluss nimmt (Abb. 22A und Abb. 22B).

Ein wichtiger Marker für die Kostimulation der T-Zellen ist PD-1. Dieses Oberflächenmolekül erreicht nach 48 h sein Expressionsmaximum, wird aber bei OT-2 ICOS KO T-Zellen schneller herunterreguliert. Dies zeigt sich an Tag 4, da nur noch 20% der OT-2 ICOS KO T-Zellen PD-1 exprimieren. Zu diesem Zeitpunkt tragen 66% der OT-2 WT T-Zellen noch PD-1 auf ihrer Oberfläche. Zudem ist die Frequenz der PD-1 positiven OT-2 WT T-Zellen auch zu späten Analysezeitpunkten (Tag 6 bis Tag 14) um Faktor 2 höher als bei OT-2 ICOS KO T-Zellen (Abb. 22C).

Der nächste analysierte Oberflächenmarker ist CD62L. Er dient der Adhäsion der T-Zellen bei ihrer Migration zum drainierenden Lymphknoten und wird von naiven T-Zellen exprimiert. Bei einer Aktivierung und Differenzierung zu Effektor- oder Gedächtnis-T-Zellen wird dieser Marker runterreguliert. Im adoptiven T-B Kooperationsmodell exprimieren schon nach 24 h nur noch 30% der transferierten T-Zellen CD62L. Bei einer ICOS-Defizienz regulieren die OT-2 ICOS KO T-Zellen den Marker an Tag 2 wieder hoch und 90% dieser T-Zellen sind positiv für CD62L. Nur etwas 50% der OT-2 WT T-Zellen tragen CD62L zu diesem Zeitpunkt auf ihrer Oberfläche, danach regulieren diese Zellen den Marker langsamer wieder hoch und erst an Tag 5 sind ca. 90% der OT-2 WT T-Zellen positiv für CD62L (Abb. 22D).

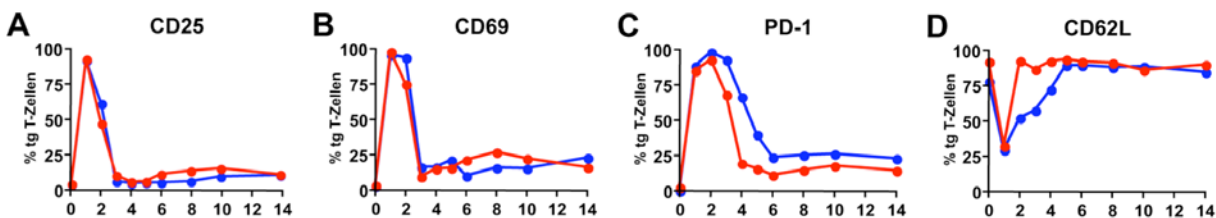


Abb. 22: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf transgenen T-Zellen

Gezeigt sind die Auswertungen der Durchflusszytometrieanalysen verschiedener Oberflächenmoleküle der transgenen T-Zellen im adoptiven T-B Transfersystem. Dafür wurden $2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen und 2×10^6 naive transgene OT-2 WT T-Zellen oder OT-2 ICOS KO T-Zellen in ICOS KO Tiere transferiert und diese mit NP-OVA/Alum + B. pert. an der Schwanzbasis immunisiert. Zu jedem Analysetag wurden die drainierenden Lymphknoten von jeweils vier Rezipienten gepoolt. Blaue Symbole in den Graphiken repräsentieren die detektierten, transgenen T-Zellen der 1. Transfergruppe (OT-2 WT T-Zellen mit B-Zellen in ICOS KO Mäusen). Die analysierten T-Zellen der 2. Transfergruppe (OT-2 ICOS KO T-Zellen mit B-Zellen in ICOS KO Mäusen) sind mit roten Symbolen gezeigt. Gezeigt sind Ergebnisse eines repräsentativen Experiments. Mehrfach unabhängig durchgeführte Untersuchungen führten zu gleichen Ergebnissen.

Zusätzlich wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle BTLA und HVEM gemessen. Diese Marker wurden durch Antigengabe auf den transferierten T-Zellen reguliert, jedoch hat eine ICOS-Defizienz keinerlei Einfluss auf deren Expressionsstärke.

3.3.3.2 Aktivierungsstatus transferierter B-Zellen im adoptiven T-B Transfermodell

Zur Untersuchung des Aktivierungsstatus der transgenen B-Zellen wurde eine Vielzahl von Oberflächenmarkern auf der Zelloberfläche der transferierten B-Zellen analysiert. Die Mehrzahl der analysierten Oberflächenmarker zeigten eine starke Regulation ihrer Expression, wobei auch eine ICOS-Abhängigkeit festgestellt wurde. Nur ein geringer Teil der untersuchten Oberflächenmarker zeigten keine Aktivierung bzw. keine Regulation durch ICOS (Tab. 6). Im folgenden Abschnitt sind die untersuchten Oberflächenmarker an Hand ihrer Funktion sortiert und deren Regulation in Abhängigkeit der ICOS-Interaktion erklärt.

Die früh exprimierten Oberflächenmarker CD25 und CD69 werden auf den transgenen B-Zellen beider Transfergruppen schon 24 h nach Immunisierung hochreguliert, womit eine Aktivierung der transgenen B-Zellen nachgewiesen wird. Dabei zeigen die B-Zellen der WT Gruppe eine höhere Expressionsstärke dieser Marker an Tag 2. Die Frequenz der CD25 positiven B-Zellen der WT Gruppe beträgt an diesem Analysetag 15%, während B-Zellen der ICOS KO Gruppe nur zu 5% positiv für CD25 sind (Abb. 23C). Die Expressionsstärke von CD69 ist ebenfalls bei der WT Gruppe um Faktor 3 höher als bei ICOS KO Gruppe (Abb. 23G). Neben der höheren Expressionsintensität dieser Aktivierungsmarker kann zusätzlich beobachtet werden, dass B-Zellen der WT Gruppe CD25 länger auf ihrer Oberfläche tragen. Der später exprimierte Aktivierungsmarker CD54 zeigt ein vergleichbares Kinetikmuster wie die schon beschriebenen Marker. Jedoch fällt der Unterschied zwischen den beiden Gruppen bei weitem nicht so stark aus (Abb. 23E).

Die Aktivierungsmarker CD23 und CD38 unterliegen bei einer B-Zellaktivierung einer Herunterregulation. Im adoptiven Transfermodell zeigen B-Zellen nach Immunisierung eine verringerte Expressionsstärke dieser Marker wobei B-Zellen der WT Gruppe diese Oberflächenmoleküle in einem größeren Ausmaß herunter regulieren. Das Expressionsminimum wird an Tag 4 nach Immunisierung in dieser Gruppe erreicht und nur rund 43% bzw. 60% der transgenen B-Zellen sind positiv für CD23 und CD38. Zusätzlich lässt sich beobachten, dass die anschließende Hochregulation nicht das Expressionsniveau der B-Zellen der ICOS KO Gruppe an Tag 5 und zu späteren Zeitpunkten erreicht. Die transgenen B-Zellen der ICOS KO Gruppe zeigen zwar eine verringerte Expression dieser beiden Marker nach Immunisierung, jedoch ist die

Herunterregulation nicht in dem Maß zu beschreiben, wie es bei einer ICOS-Interaktion zwischen T- und B-Zellen der Fall ist (Abb. 23A und Abb. 23D).

Ein weiteres Oberflächenmolekül, das durch eine Aktivierung stark induziert wird, ist CD24. Weiterhin fördert eine Signaltransduktion über CD24 die B-Zellproliferation. Eine Interaktion mit dem kostimulatorischen Molekül BAFF-R induziert ebenfalls die B-Zellproliferation. Beide Oberflächenmoleküle werden im T-B Kooperationsmodell nach Immunisierung induziert, wobei die Expression dieser Antigene auf den transgenen B-Zellen der WT Gruppe signifikant höher ist als bei B-Zellen der ICOS KO Gruppe. Das Maximum der Expression für BAFF-R und CD24 wird 3 Tage nach Immunisierung in beiden Transfergruppen erreicht und nach 6 bzw. 8 Tagen wird der Ausgangswert der Expression erreicht (Abb. 23B und Abb. 23O). Auch hier kann beobachtet werden, dass eine Interaktion mit ICOS zu einer längeren Expression wichtiger Marker führt, die essentiell für die B-Zellproliferation sind.

Eine negative Regulation der B-Zellproliferation wird über die Signaltransduktion von TACI und CD95 erreicht. Das Binden von BAFF an seinen Rezeptor TACI führt zur Herunterregulation der B-Zellaktivierung und Expansion (Mackay et al, 2008). CD95 (Fas), ein Mitglied der TNF-R Superfamilie, wird auf reifen Lymphozyten exprimiert. Eine Interaktion mit seinem Ligand FasL führt zur Induktion der Apoptose. Durchflusszytometrieanalysen dieser Oberflächenmoleküle zeigen auf transgenen B-Zellen beider Transfergruppen eine Hochregulation der Expression nach Immunisierung. Die mittlere Fluoreszenzstärke transgener B-Zellen der WT Gruppe von TACI ist an Tag 3 um 40% höher als auf B-Zellen, die keine ICOS-Interaktion erfahren konnten. Zudem ist auch hier eine verlangsamte Herunterregulation von TACI zu beobachten (Abb. 23N). Der Effekt von ICOS ist bei der CD95 Induzierung noch stärker messbar. So exprimieren an Tag 4 70% der transgenen B-Zellen der WT Gruppe CD95, während nur 40% der transgenen B-Zellen der ICOS KO Gruppe dieses Molekül auf der Zelloberfläche tragen. Zudem führt eine ICOS-Stimulation bis zum 10. Analysetag zu einer um Faktor 2 höheren CD95 Expression (Abb. 23J).

Die Kostimulatorliganden PD-L1, CD86 und CD80 gehören zu der Klasse von Molekülen, die nach Immunisierung in ihrer Expressionsstärke deutlich heraufreguliert werden. Das Expressionsmaximum von PD-L1 wird an Tag 2 erreicht. Die Frequenz der PD-L1 exprimierenden, transgenen B-Zellen der WT Gruppe liegt bei ca. 52%. Nur etwa 36% der transgenen B-Zellen der ICOS KO Gruppe tragen zu diesem Zeitpunkt das kostimulatorische Molekül auf der Zelloberfläche. Vier Tage nach Immunisierung erreicht die Zellfrequenz der PD-L1 exprimierenden B-Zellen wieder das Ausgangsniveau (Abb. 23M). Die Expressionsmaxima von CD86 und CD80 werden an Tag 3 bzw. Tag 4 erreicht, wobei die Interaktion von ICOS keinen Einfluss auf die Frequenzen der CD86+ und CD80+ transgenen B-Zellen hat. Erst 5 Tage nach Immunisierung wird

deutlich, dass eine fehlende ICOS-Expression zu einer stärkeren Herunterregulation von CD86 und CD80 auf den transgenen B-Zellen führt (Abb. 23I und Abb. 23H). Zur Kontrolle der ICOS-Interaktion von T- und B-Zellen wurde die ICOS-L Expression auf transgenen B-Zellen in der Durchflusszytometrie analysiert. In der WT Gruppe interagieren die B-Zellen mit den ICOS-exprimierenden transgenen T-Zellen, was zu einer drastischen Herunterregulation der mittleren Fluoreszenzintensität von ICOS-L führt (Logue et al., 2006). Die fehlende ICOS-Kostimulation in der ICOS KO Gruppe beeinflusst die ICOS-L Expression auf den transgenen B-Zellen nicht (Abb. 23P).

Das Oberflächenmolekül CD62L dient bei der Migration von Lymphozyten der Adhäsion. Bei einer Differenzierung der B-Zellen wird der Oberflächenmarker, wie bei T-Zellen, herunterreguliert. Die Expressionskinetik dieses Oberflächenmoleküls zeigt eine signifikante Herunterregulation auf transgenen B-Zellen in der WT Gruppe. Die Frequenz der CD62L+ transgenen B-Zellen beträgt an Tag 5 nach Immunisierung nur 20% und ist um Faktor 3 geringer als die Frequenz der transgenen CD62L+ B-Zellen der ICOS KO Gruppe (ca. 60% der transgenen B-Zellen der ICOS KO Gruppe exprimieren CD62L zu diesem Zeitpunkt) (Abb. 23F). Weitere wichtige Marker, die im adoptiven T-B Transfermodell in der Durchflusszytometrie analysiert wurden, sind die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR5. Auch sie sind für die Lymphozytenmigration wichtig. Eine Immunisierung führt zur Expressionsinduktion auf transgenen B-Zellen. Die fehlende ICOS-Interaktion von T- und B-Zellen führt zu jedoch zur verringerten Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR5 wobei der Effekt bei CXCR5 stärker ist (Abb. 23K und Abb. 23L).

Es wurde beschrieben, dass nach einer B-Zellaktivierung die B-Zellrezeptoren herunterreguliert werden. Dies sollte mit Hilfe des Antikörpers Ac146 und fluoreszenzmarkierten Antigen (NP-APC), die beide den transgenen BZR detektieren können, nachgewiesen werden. Ist dies der Fall, unterliegt auch der Oberflächenmarker MHC-II eine Regulation. Schon einen Tag nach Immunisierung regulieren die NP-spezifischen B Zellen ihren BZR herunter, das Minimum der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des BZRs ist nach 4 Tagen erreicht. Der MFI-Wert des BZRs auf transgene-B Zellen der WT Gruppe entspricht einem MFI-Wert einer negativen BZR-Expression. B-Zellen der ICOS KO Gruppe zeigen ebenfalls eine Herunterregulation des BZRs, jedoch nicht in dieser Intensität (Abb. 23U und Abb. 23V). Die Expressionskinetik von MHC-II auf transgenen B-Zellen folgt einem anderen Muster. So scheint es, dass zwei Tage nach Immunisierung die MHC-II Expression erst hochreguliert wird und danach eine Herunterregulation erfolgt, die aber nicht das Startniveau erreicht. Eine ICOS-Interaktion jedoch führt zur einem stärkeren Abfall der MHC-II Expression auf transgenen B-Zellen nach Tag 3 (Abb. 23Q).

Besonders gut beschrieben ist der Differenzierungsstatus der B-Zellen über die Oberflächenmarker IgM und IgD. So definiert eine IgM+IgD⁺ Expression naive B-Zellen, eine Herunterregulation von IgD beschreibt aktivierte B-Zellen und bei B-Zellen, die weder IgM noch IgD exprimieren, handelt es sich um differenzierte, klassengewechselte B-Zellen. Im adoptiven T-B Transfermodell lässt sich beobachten, dass bei einer ICOS-Interaktion die Anzahl der naiven, transgenen B-Zellen stärker abnimmt. Nur 17% der transgenen B-Zellen der WT Gruppe exprimieren IgM und IgD an Tag 4. Zu diesem Zeitpunkt tragen jedoch noch 40% der transgenen B-Zellen der ICOS KO Gruppe IgM und IgD auf ihrer Zelloberfläche (Abb. 23R). Die Frequenz der IgM+IgD⁻ transgenen B-Zellen der WT Gruppe ist zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zur ICOS KO Gruppe um ca. 10 % erhöht wodurch eine stärkere Aktivierung der ICOS-Stimulation erklärbar ist. Besonders deutlich ist der Effekt von ICOS, wenn die Frequenz der klassengewechselten B-Zellen analysiert wird. Fünf Tage nach Immunisierung sind in der WT Gruppe siebenmal mehr transgene B-Zellen klassengewechselt als in der ICOS KO Gruppe.

Oberflächenmarker, wie CD21, IL7R, CXCR4 und PD-1 werden zwar durch eine Immunisierung auf transgenen B-Zellen reguliert, jedoch spielt die Interaktion von ICOS in der Expressionsregulation keine Rolle. Die Expression von CD27, CD30, CD44, CD70, CD103, 4-1BB-L und PD-L2 auf transgenen B-Zellen wird weder durch Immunisierung reguliert noch unterliegen sie einer ICOS-Abhängigkeit.

Die sehr ausführliche Untersuchung verschiedener Oberflächenmarker auf transgenen B-Zellen im T-B Kooperationsmodell zeigt, dass ICOS zur vollständigen Aktivierung der B-Zellen benötigt wird und der Aktivierungsstatus nur beim Kontakt mit ICOS-exprimierten T-Zellen für eine längere Zeit aufrechterhalten bleibt. Eine ausreichende Expression der Proliferationsmarker ist nur bei einer ICOS-Interaktion möglich, wodurch auch die negative Rückkopplung der Expansion vollständig ausgebildet wird. Nicht zu vernachlässigen ist die Rolle von ICOS bei der verstärkten Expression wichtiger Adhäsionsmoleküle, die bei der Migration essentiell sind. Zudem benötigen die Mehrzahl der transgenen B-Zellen eine ICOS-Stimulation, um einen Ig-Klassenwechsel durchzuführen.

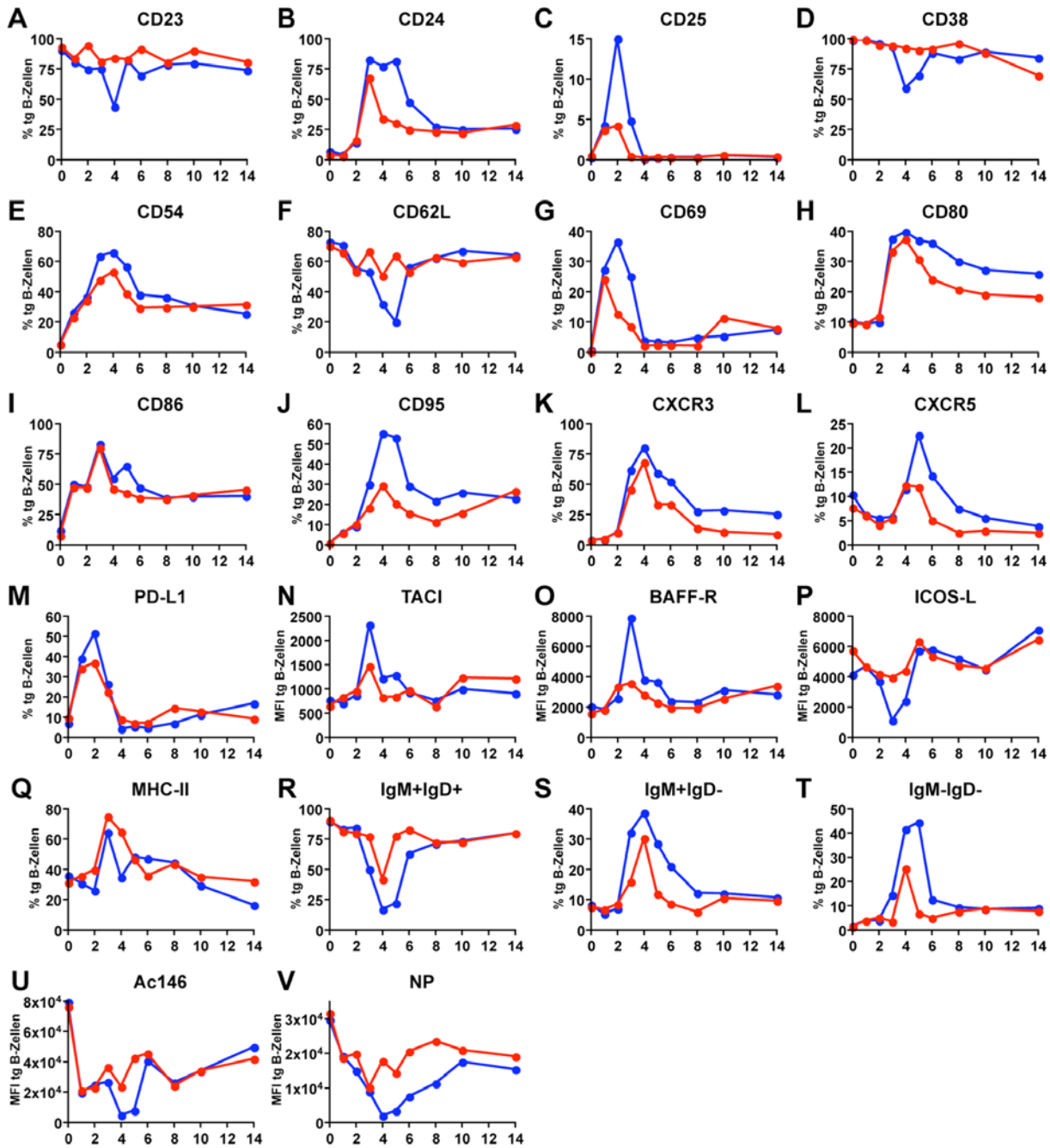


Abb. 23: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf transgenen B-Zellen

Dargestellt sind die Durchflusszytometrieanalysen verschiedener Oberflächenmoleküle der transgenen B-Zellen im adoptiven T-B Transfersystem. Dafür wurden $2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen und 2×10^6 naive transgene OT-2 WT T-Zellen oder OT-2 ICOS KO T-Zellen in ICOS KO Tiere transferiert und diese mit NP-OVA/Alum + B. pert. an der Schwanzbasis immunisiert. Zu jedem Analysetag wurden die drainierenden Lymphknoten von jeweils vier Rezipienten gepoolt. Blaue Symbole in den Graphiken repräsentieren die detektierten, transgenen B-Zellen der 1. Transfergruppe (OT-2 WT T-Zellen mit B-Zellen in ICOS KO Mäuse). Die analysierten B-Zellen der 2. Transfergruppe (OT-2 ICOS KO T-Zellen mit B-Zellen in ICOS KO Mäusen) sind mit roten Symbolen gezeigt. Mehrfach unabhängig durchgeführte Untersuchungen führten zu gleichen Ergebnissen.

3.3.4 Kann eine höhere Gabe von transferierten T-Zellen den Effekt der ICOS-Defizienz ausgleichen?

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass eine fehlende Interaktion zwischen ICOS-tragenden T- und B-Zellen im adoptiven T-B Transfermodell zu einem verringerten Aktivierungsstatus der B-Zellen führt. Dies äußert sich in einer verringerten Expansion und Proliferation der B-Zellen. Zusätzlich ist eine Stimulation über ICOS nötig, damit B-Zellen weiter differenzieren und einen Ig-Klassenwechsel durchführen. Die OT-2 ICOS KO T-Zellen unterscheiden sich in der frühen Differenzierung aber praktisch nicht von den OT-2 WT T-Zellen (Abb. 22 und nicht gezeigte Daten). Nur die Anzahl der transgenen T-Zellen ist in der ICOS KO Gruppe erniedrigt. Aus diesem Grund könnte man vermuten, dass die B-Zelleffekte durch die verringerte Anzahl an OT-2 ICOS KO T-Zellen verursacht werden. Daher wurde untersucht, ob eine höhere Gabe von transferierten T-Zellen zu einer Kompensierung der B-Zelleffekte führen kann. Für diese komplexen Untersuchungen wurden CFSE-markierte, transgene B-Zellen mit transgenen OT-2 WT T-Zellen oder OT-2 ICOS KO T-Zellen in gesteigerter Anzahl in ICOS KO Rezipienten transferiert. Die insgesamt 6 Rezipientengruppen wurden mit NP-OVA/Alum + B. pert. immunisiert. Nach drei, vier, fünf und neun Tagen nach Immunisierung wurden die drainierenden Lymphknoten der Rezipienten in der Durchflusszytometrie auf die Expansion bzw. Proliferation und der Aktivierungsstatus der transgenen B-Zellen hin analysiert. In der Tab. 7 ist die Anzahl der transferierten, transgenen T- und B-Zellen der einzelnen Rezipientengruppen zusammengefasst.

Transfergruppe	transferierte B-Zellen	transferierte T-Zellen
1. Gruppe	$2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen	1×10^6 transgene OT-2 WT T-Zellen
2. Gruppe	$2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen	2×10^6 transgene OT-2 WT T-Zellen
3. Gruppe	$2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen	4×10^6 transgene OT-2 WT T-Zellen
4. Gruppe	$2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen	1×10^6 transgene OT-2 ICOS KO T-Zellen
5. Gruppe	$2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen	2×10^6 transgene OT-2 ICOS KO T-Zellen
6. Gruppe	$2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen	4×10^6 transgene OT-2 ICOS KO T-Zellen

Tab. 7: Übersicht der Transfergruppen

Vergleicht man das Expansionsmuster der transgenen B-Zellen der sechs Transfergruppen, so stellt man fest, dass weder die Anzahl der transferierten T-Zellen noch deren ICOS-Expression einen Einfluss auf die Expansionskinetik der B-Zellen haben. An Tag 3 unterscheiden sich die Zellfrequenzen der transgenen B-Zellen nicht zwischen den sechs Transfergruppen. Das Maximum der B-Zellexpansion wird vier Tage nach Immunisierung erlangt und an Tag 9 erreicht die Frequenz der transgenen B-Zellen wieder ihren Ausgangswert. Die ICOS-Expression der transferierten T-Zellen spielt jedoch eine entscheidende Rolle beim Expansionsmaximum der transgenen

B-Zellen. Bei einem Transfer von 1×10^6 transgenen OT-2 WT T-Zellen können mittels Durchflusszytometrieanalysen ca. 6% transgene B-Zellen in den drainierenden Lymphknoten der Rezipienten an Tag 4 detektiert werden. Transferiert man doppelt so viele transgene OT-2 WT T-Zellen, so verdoppelt sich auch die Frequenz der transgenen B-Zellen. Verdoppelt man wiederum die Gabe von transgenen OT-2 WT T-Zellen (4×10^6), expandiert die Frequenz der transgenen B-Zellen auf rund 16%. Da in diesem Fall die Expansionsrate nicht mehr um den Faktor 2 steigt, kann man davon ausgehen, dass bei einem Transfer von 4×10^6 transgenen OT-2 WT T-Zellen das System abgesättigt ist. Ein Transfer von 1×10^6 transgenen OT-2 ICOS KO T-Zellen führt zu einer Expansion der transgenen B-Zellen und die Frequenz beträgt ca. 2%. Die Verdopplung der Gabe der transgenen OT-2 ICOS KO T-Zellen hat auch eine Verdopplung der transgenen B-Zellfrequenz zur Folge. Transferiert man 4×10^6 transgene OT-2 ICOS KO T-Zellen, so beträgt die Frequenz der transgenen B-Zellen nur etwa 5%. Da auch hier die Expansionsrate der transgenen B-Zellen nicht um den Faktor 2 steigt, kann vermutet werden, dass ein Transfer von 4×10^6 transgenen OT-2 ICOS KO T-Zellen zu einer Sättigung des Systems führt. Bei gleicher Anzahl von transferierten T-Zellen führt die ICOS-Interaktion zu einer dreimal höheren B-Zellexpansion. Die verringerte B-Zellexpansion der ICOS KO Gruppe kann nur mit einer Gabe von viermal mehr OT-2 ICOS KO T-Zellen annähernd ausgeglichen werden (Vergleich 1. Transfergruppe mit 6. Transfergruppe) (Abb. 24).

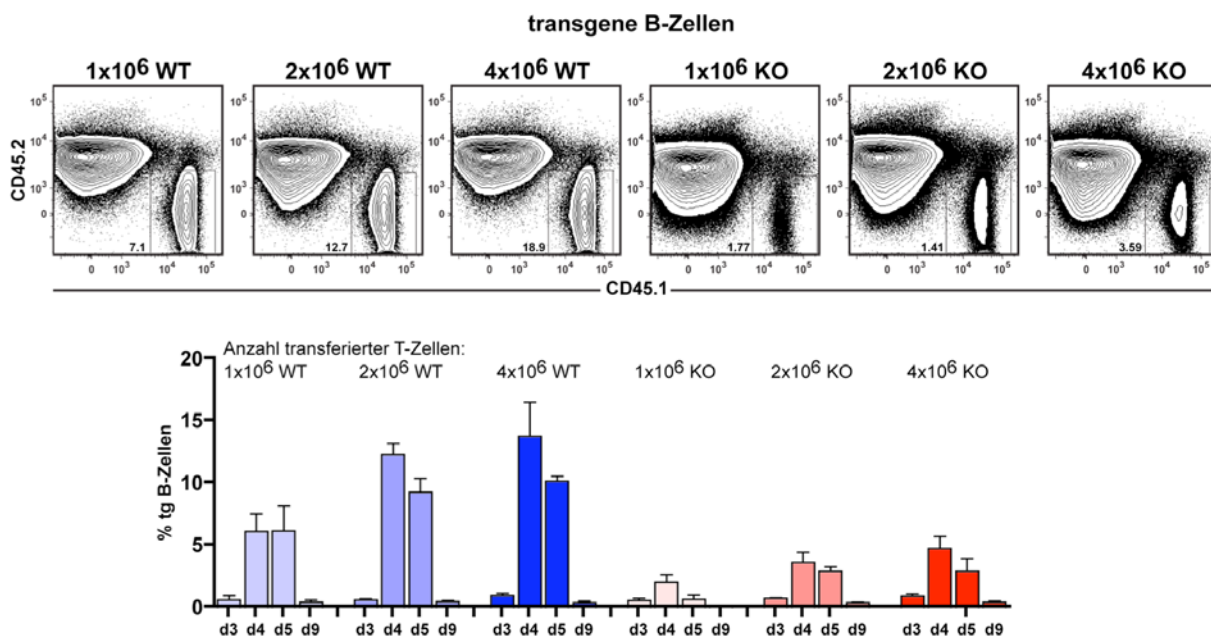


Abb. 24: Die B-Zellexpansion in Abhängigkeit der T-Zellzahl

Gezeigt sind repräsentative Durchflusszytometrieanalysen und deren graphische Analysen der transgenen B-Zellen im adoptiven T-B Transfermodell. Es wurden $2,5 \times 10^6$ CFSE-markierte, transgene B-Zellen und naive transgene OT-2 WT T-Zellen oder OT-2 ICOS KO T-Zellen in steigenden Mengen in ICOS KO Tiere transferiert und diese mit NP-OVA/Alum + B. pert. an der Schwanzbasis immunisiert. Blaue Balken in den Graphen repräsentieren Tiere der OT-2 WT T-Zellen mit B-Zellen Transfergruppen, die roten Balken repräsentieren Tiere der OT-2 ICOS KO T-Zellen mit B-Zellen Transfergruppen. Bei jedem Analysezeitpunkt wurden vier Tiere für die Statistik zusammengefasst.

Der Einfluss von unterschiedlichen Mengen ICOS-exprimierender, transgener T-Zellen auf die Proliferation der transgenen B-Zellen wurde mit Hilfe der CFSE-Markierung ebenfalls in der Durchflusszytometrie untersucht (Abb. 25A). Deutlich erkennbar ist, dass mit zunehmender Anzahl transferierter, transgener T-Zellen die Proliferation der transgenen B-Zellen beschleunigt wird. Die gesteigerte Anzahl von transferierten OT-2 WT T-Zellen resultiert in einer stetigen Abnahme der Frequenz der CFSE⁺, ungeteilten transgenen B-Zellen (Generation 0) um den Faktor 2. Auch in den ICOS KO Gruppen ist eine Abnahme der B-Zellen der Generation 0 zu beobachten. Vergleicht man die WT mit den KO Gruppen, so kann man feststellen, dass die ICOS-Interaktion bei gleicher Anzahl von transferierten T-Zellen zu einer zweimal höheren B-Zellproliferation führt. Die verringerte Proliferation der transgenen B-Zellen der ICOS KO Gruppe kann jedoch durch eine Gabe von zweimal mehr transgener OT-2 ICOS KO T-Zellen ausgeglichen werden (Vergleich 2. Transfergruppe mit 6. Transfergruppe).

Ob die verringerte B-Zellaktivierung und Fähigkeit zum Ig-Klassenwechsel bei einer ICOS-Defizienz durch eine erhöhte Gabe transgener OT-2 ICOS KO T-Zellen kompensiert werden kann wurde mit den Oberflächenmarkern IgM und IgD untersucht (Abb. 25B). Die statistische Auswertung zeigt, dass weder die Anzahl der transferierten T-Zellen noch deren ICOS-Expression einen Einfluss auf die Expressionskinetik von IgM und IgD auf transgenen B-Zellen haben (Daten nicht gezeigt). An Tag 5 nach Immunisierung detektiert man in allen sechs Transfergruppen die geringste Frequenz von transgenen IgM⁺IgM⁺ B-Zellen und die höchste Frequenz von transgenen IgM⁺IgD⁻. Schon ein Transfer von 1×10^6 transgener OT-2 WT T-Zellen führt dazu, dass 90% der transgenen B-Zellen aktiviert werden und nicht mehr IgM und IgD koexprimieren. Eine Verdopplung der OT-2 WT T-Zellen kann diesen Effekt noch leicht steigern. Danach tritt der Sättigungseffekt des Systems ein und eine Erhöhung der OT-2 WT T-Zellgabe hat keinen Einfluss mehr auf die IgM⁺IgD⁺ Expression der transgenen B-Zellen. Eine zunehmende OT-2 ICOS KO T-Zellgabe führt auch zu einer Abnahme der transgenen IgM⁺IgD⁺ B-Zellfrequenz um Faktor 2. Transferiert man 4×10^6 transgene OT-2 ICOS KO T-Zellen, so beträgt die Frequenz der transgenen IgM⁺IgD⁺ B-Zellen nur noch etwa 13%. Die Frequenz der transgenen IgM⁺IgD⁻ B-Zellen verhält sich reziprok zur Frequenz der IgM⁺IgD⁺ exprimierenden transgenen B-Zellen. Auch hier führt schon die geringe Anzahl von 1×10^6 transgenen OT-2 WT T-Zellen dazu, dass 45% der transgenen B-Zellen einen Ig-Klassenwechsel durchführen. Eine Verdopplung bzw. Vervierfachung der OT-2 WT T-Zellen steigert diesen Effekt nur noch leicht. Die gesteigerte Anzahl von transferierten OT-2 ICOS KO T-Zellen führt ebenfalls zu einer stetigen Zunahme der transgenen IgM⁺IgD⁻ B-Zellfrequenz. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine viermal höhere Gabe von OT-2 ICOS KO T-Zellen den Differenzierungsstatus der B-Zellen nicht erreicht, den man bei einem Transfer

von 1×10^6 transgenen OT-2 WT T-Zellen beobachten kann. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Aktivierungs- und Keimzentrumsmarker GL7 und CD95 erhalten.

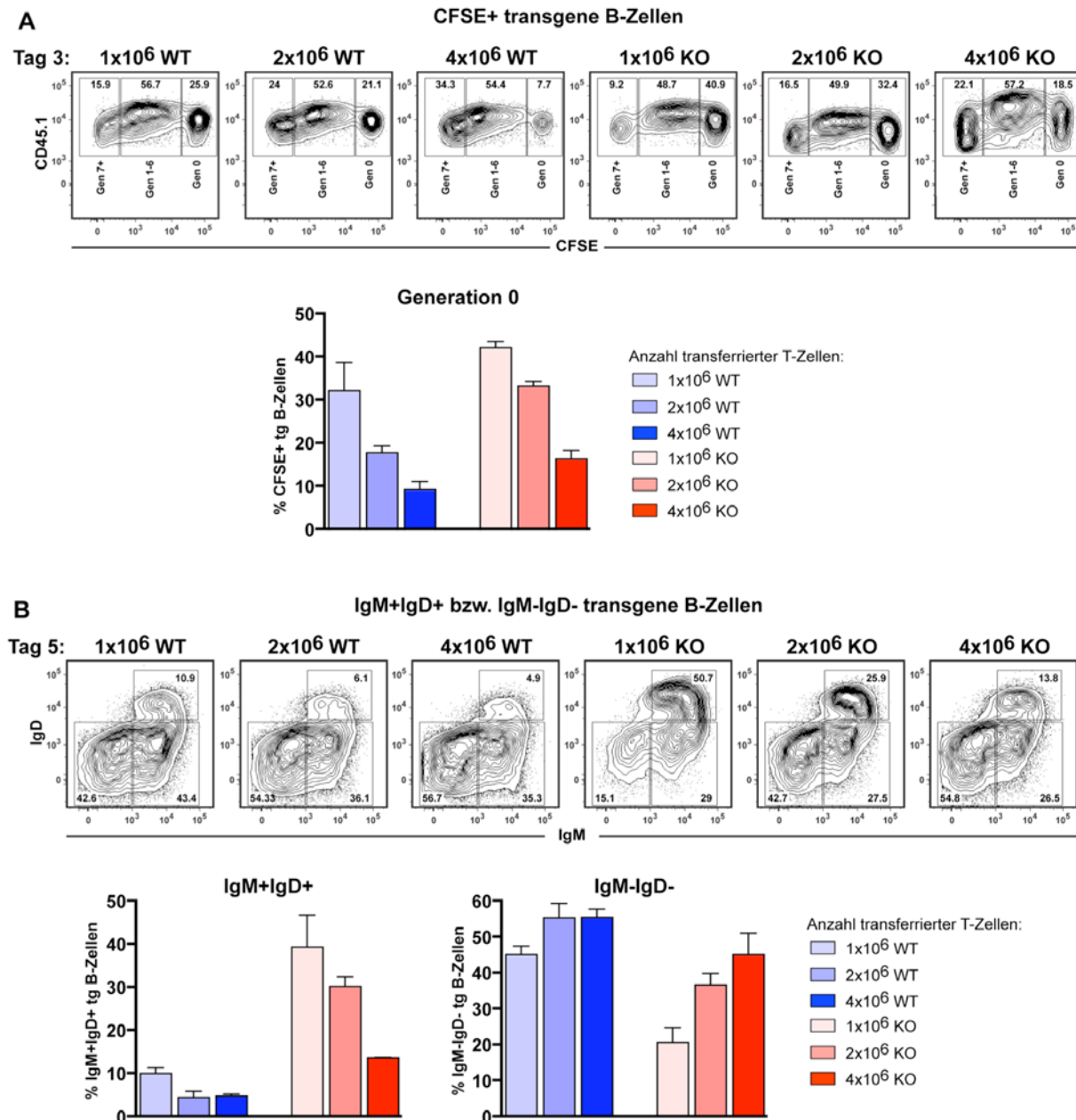


Abb. 25: Die B-Zellaktivierung und Proliferation in Abhängigkeit der T-Zellzahl

Gezeigt sind repräsentative Durchflusszytometrieanalysen und deren statistischen Analysen der transgenen B-Zellen im adoptiven T-B Transfermodell. Es wurden $2,5 \times 10^6$ CFSE-markierte, transgene B-Zellen und naive transgene OT-2 WT T-Zellen oder OT-2 ICOS KO T-Zellen in steigenden Mengen in ICOS KO Tiere transferiert und diese mit NP-OVA/Alum + B. pert. an der Schwanzbasis immunisiert. Die B-Zellproliferation wurde mit Hilfe des CFSE-Signals der transgenen B-Zellen untersucht (A). Die B-Zellaktivierung und der Ig-Klassenwechsel wurden mit der IgM und IgD Expression der transgenen B-Zellen bestimmt (B). Blaue Balken in den Graphen repräsentieren Tiere der OT-2 WT T-Zellen mit B-Zellen Transfergruppen, die roten Balken repräsentieren Tiere der OT-2 ICOS KO T-Zellen mit B-Zellen Transfergruppen. Bei jedem Analysezeitpunkt wurden sechs Tiere für die Statistik zusammengefasst.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die verringerte B-Zellexpansion bzw. B-Zellproliferation, die verminderte B-Zellaktivierung und Fähigkeit zum Ig-Klassenwechsel, die durch die

ICOS-Defizienz der transferierten T-Zellen verursacht wurde, durch eine erhöhte Anzahl von transgenen OT-2 ICOS KO T-Zellen kompensiert werden konnte. Jedoch ist eine mindestens viermal höhere Gabe von OT-2 ICOS KO T-Zellen im Vergleich zu OT-2 WT T-Zellen nötig um die B-Zelleffekte im adoptiven T-B Kooperationsmodell auszugleichen.

3.4 Die Rolle von ICOS auf die Keimzentrumsentwicklung

Die Bedeutung von ICOS für die B-Zelldifferenzierung wurde durch *in vitro* T-B Untersuchungen und *ex vivo* Expressionsanalysen deutlich, wobei vor allem die Generierung von ICOS bzw. ICOS-L defizienter Mäuse zu diesen Studien beigetragen haben (Dong et al., 2001a; Tafuri et al., 2001; McAdam et al., 2001; Wong et al., 2003; Mak et al., 2003). Die Zellzahlen der T- und B-Zellen werden durch eine ICOS-Defizienz nicht verändert. Jedoch findet man in diesen Tieren deutlich kleinere Keimzentren. In weiteren Untersuchungen sollen mögliche Mechanismen aufgeklärt werden, die zur verringerten Keimzentrumsproduktion in ICOS KO Tieren führt. Das adoptive T-B Transfermodell erlaubt es, den Einfluss von ICOS-defizienten T-Zellen und deren Funktion auf die Keimzentrumsentwicklung besser zu verstehen.

3.4.1 Identifikation von Keimzentrums-B-Zellen

In den meisten Publikationen zur Keimzentrumsentwicklung werden Antikörper gegen die Oberflächenmarker PNA, GL7 und CD95 verwendet, um Keimzentrums-B-Zellen in der Durchflusszytometrie oder in der Histologie zu detektieren. Alle drei Marker haben den Nachteil, dass sie nicht exklusiv auf Keimzentrums-B-Zellen exprimiert werden. Das Lektin PNA (peanut agglutinin), ein Protein aus der Erdnuss, bindet bevorzugt an Gal- (1-3)-GalNAc- (Galaktosyl (b-1,3) N-Acetylgalaktosamin) Zucker. Diese Sequenz befindet sich in vielen Glykokonjugaten und in löslichen bzw. membrangebundenen Glykoproteinen, die z. B. in Endothelzellen vorkommen. Monoklonale Antikörper gegen GL7 binden an ein 35 kDa großes Oberflächenprotein, dass von *in vitro* aktivierten T- und B-Zellen, Vorläufer-B-Zellen im Knochenmark und von einer T-Zellsubpopulation mit hohem CD3 ϵ Level exprimiert wird. Weiterhin wird das Oberflächenantigen CD95 zur Keimzentrumsdetektion verwendet. CD95 wird von hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen, wie Fibroblasten, Monozyten, neutrophile und aktivierte Lymphozyten exprimiert. Zur Bestimmung von Keimzentren in der Histologie reicht ein Marker wie PNA oder GL7 zur Detektion aus (Abb. 26B), da man neben der Architektur des Lymphorgans auch die charakteristische Form des Keimzentrums in der B-Zellzone zur Identifikation verwenden kann. Eine Doppelfärbung von GL7 und PNA identifiziert in der

Histologie jedoch ein Keimzentrum am besten. Zusätzlich findet man auch PNA+ (mit Pfeilen gekennzeichnet) und GL7+ (mit Sternsymbolen gekennzeichnet) Zellen, die sich eindeutig nicht im Keimzentrum befinden sondern über das ganze Lymphorgan verteilt sind. Zur Bestimmung von Keimzentrums-B-Zellen in der Durchflusszytometrie ist es neben der Verwendung von B220 oder CD19 empfehlenswert mindestens zwei Oberflächenantigene zu detektieren. In Abb. 26A erkennt man B-Zellen, die nur PNA exprimieren. Diese Zellen haben über die Gal- β (1-3)-GalNAc-Struktur PNA unspezifisch gebunden und gehören nicht zu den Keimzentrums-B-Zellen. Weiterhin identifiziert man B-Zellen, die nur GL7 auf der Zelloberfläche tragen. Nur eine Koexpression von PNA und GL7 identifiziert Keimzentrums-B-Zellen in der Durchflusszytometrie am ehesten wobei Analysen mit Hilfe der Histologie diese Aussage bestätigen. Weiterhin dient zur Identifikation von Keimzentrums-B-Zellen die Information, dass über 90% der PNA+GL7+ B-Zellen CD95 exprimieren und IgD herunterreguliert haben.

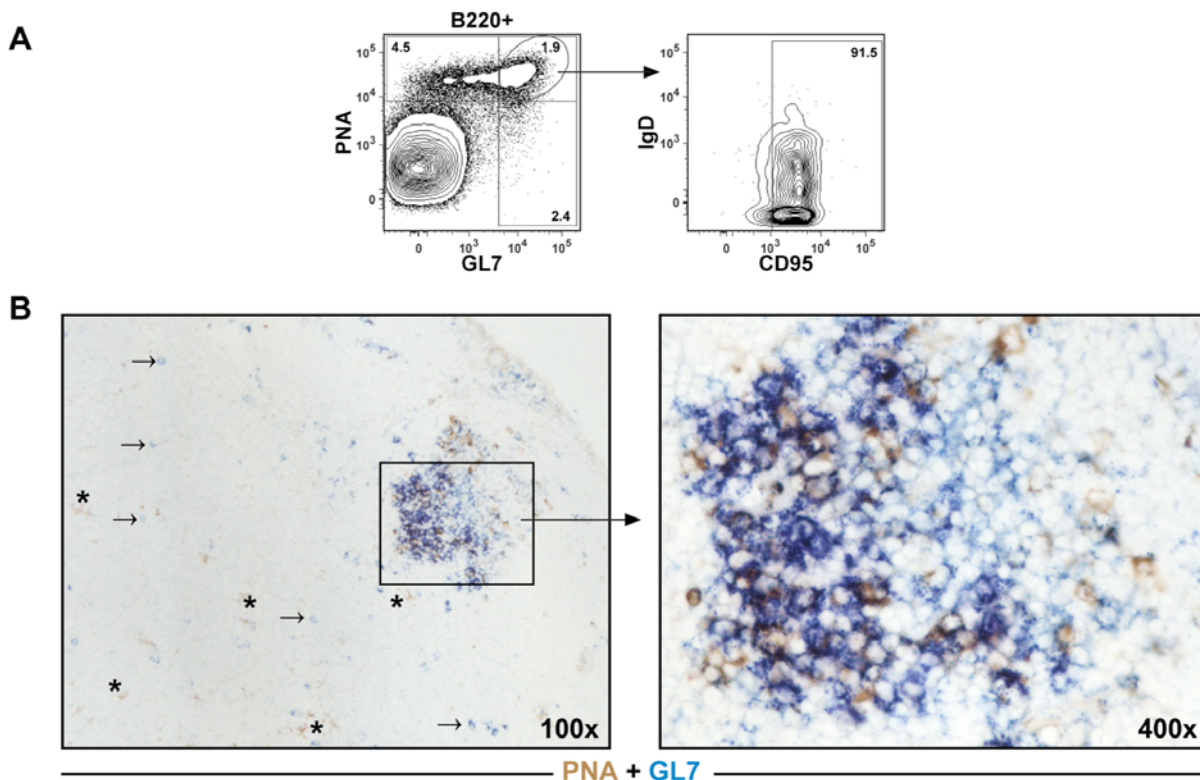


Abb. 26: Definition der Keimzentrums-B-Zellen in der Durchflusszytometrie und in der Histologie

Zur Analyse von Keimzentrums-B-Zellen wurden WT Mäuse mit NP-OVA/Alum + B. pert. i.p. immunisiert und die Milzen 12 Tage nach Immunisierung in der Durchflusszytometrie (A) und mit Hilfe der Immunhistologie (B) analysiert. Die Abb. 26A zeigt eine repräsentative Durchflusszytometrieanalyse von Keimzentrums-B-Zellen, die über eine positive PNA, GL7 und CD95 Expression bestimmt wurden. Zur Bestimmung von Keimzentren in der Immunhistologie wurden die dargestellten Kryoschnitte mit PNA (braun) und GL7 (blau) angefärbt und mit einer 100fachen bzw. 400fachen Vergrößerung abfotografiert. Exemplarisch markieren Pfeilsymbole GL7+ Zellen, Sternsymbole markieren PNA+ Zellen, die nicht als Keimzentrums-B-Zellen identifiziert werden dürfen.

3.4.2 Die Keimzentrumsentwicklung in C57BL/6 WT und ICOS KO Mäusen

Zuerst sollte die Expansion der Keimzentrums-B-Zellen am Maximum der Keimzentrumsreaktion in WT und ICOS KO Mäusen untersucht werden. Dafür wurden WT und ICOS KO Tiere mit NP-OVA/ALUM + B. pert. i.p. immunisiert und nach 12 Tagen wurden die Milzen in der Durchflusszytometrie auf die Frequenz der Keimzentrums-B-Zellen analysiert. Zur genaueren Identifikation von Keimzentrums-B-Zellen dient eine Koexpression von PNA und GL7 auf B220 positiven B-Zellen. WT Mäuse zeigen am Maximum der Keimzentrums-reaktion eine Frequenz von etwa 1,8% PNA+GL7+ B-Zellen. Eine ICOS-Defizienz führt zu einer signifikant geringeren Frequenz von Keimzentrums-B-Zellen. In diesem Fall konnten in der Durchflusszytometrie nur ca. 0,15% PNA+GL7+ B-Zellen detektiert werden (Abb. 27A).

Im Keimzentrum befinden sich Antigen-spezifische B-Zellen, TFH und FDZ, die zusammen die Keimzentrumsreaktion induzieren, erhalten und regulieren. Während der Keimzentrumsentwicklung interagieren Antigen-spezifische B-Zellen mit dem FDZ-Netzwerk im Keimzentrum. Untersuchungen zeigten, dass die FDZ den B-Zellen Antigene nicht nur präsentieren, sondern durch den Kontakt den B-Zellen Signale zum Überleben vermittelt werden. Daher kann vermutet werden, dass die verminderte Keimzentrumsproduktion bei ICOS KO Mäusen durch einen verringerten Kontakt zwischen B-Zellen und FDZ im Keimzentrum zustande kommt. Zur Belegung dieser Theorie wurden von WT und ICOS KO am Maximum der Keimzentrumsreaktion sequenzielle Kryoschnitte der gesamten Milzen gefertigt und diese in der Histologie untersucht. Dabei wurden 15 Kryoschnitte pro Mausmilz zufällig ausgewählt und die Keimzentren bzw. FDZ-Strukturen wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert und die Fläche der angefärbten Areale dieser Strukturen statistisch analysiert. Eine ICOS-Defizienz führt nicht nur zu einer verringerten Keimzentrumsanzahl, sondern die Fläche der entwickelten Keimzentren ist um Faktor 3 kleiner als im Vergleich zu WT Mäusen. Die durchschnittliche Gesamtfläche der Keimzentren beträgt bei einer WT Maus ca. 1500 μm^2 , bei einer ICOS KO Maus nur etwa 250 μm^2 (Abb. 27B).

Die Anzahl und Fläche der FDZ-Strukturen hingegen wird durch eine ICOS-Defizienz erhöht. Die Auswertung der Kryoschnitte zeigt, dass bei WT Tieren im Durchschnitt etwa 35 FDZ-Strukturen, bei ICOS KO Tieren ca. 48 FDZ-Regionen gezählt werden können. Die erhöhte Anzahl der FDZ-Regionen spiegelt sich auch in der durchschnittlichen Gesamtfläche der FDZ-Areale wieder. So konnte bei WT Tieren eine Gesamtfläche von ca. 1000 μm^2 , bei ICOS KO Tieren etwa 1700 μm^2 gemessen werden (Abb. 27C).

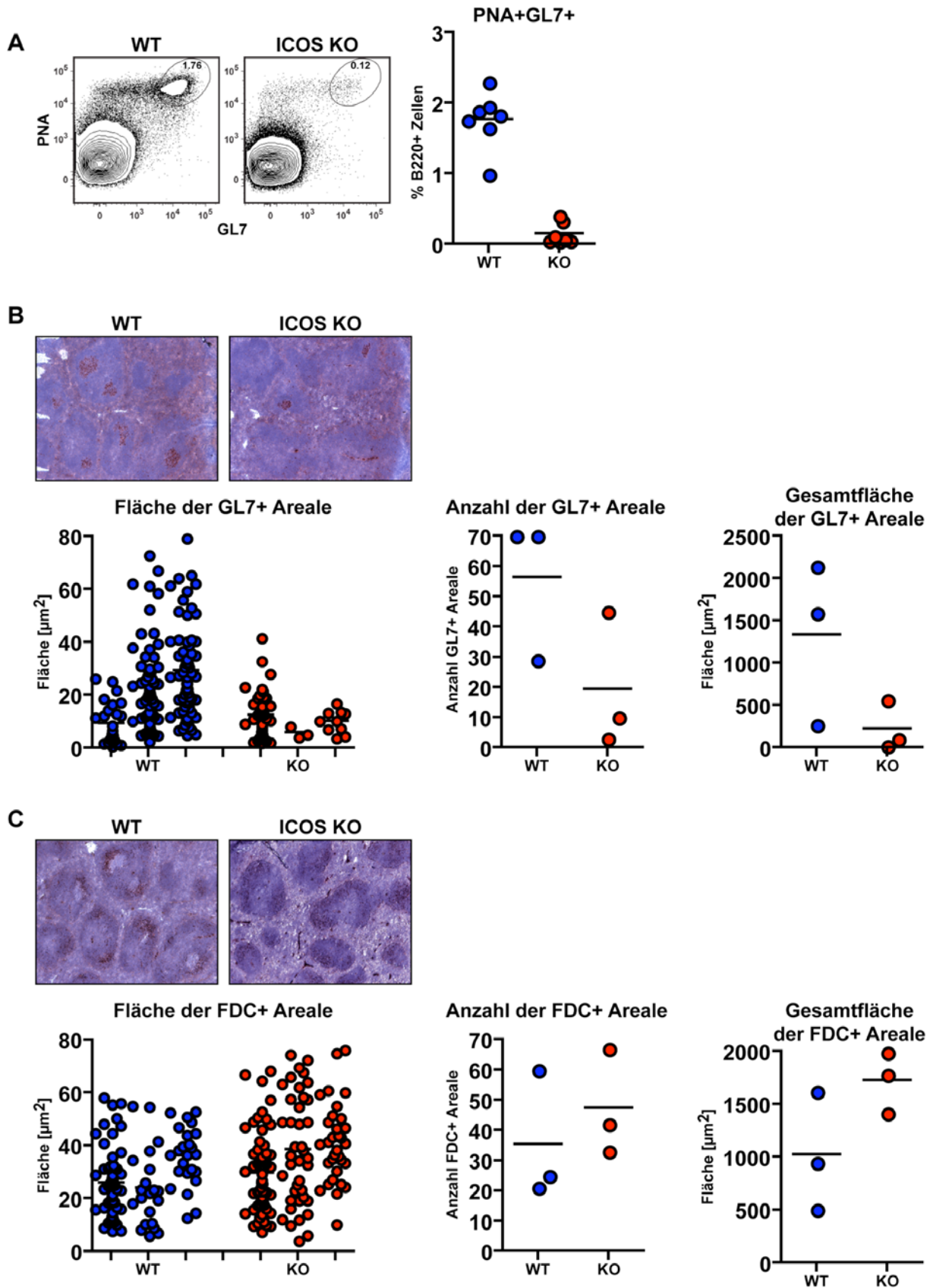


Abb. 27: Der Einfluss von ICOS auf die Keimzentrsreaktion

Zur Analyse von Keimzentrs-B-Zellen wurden WT und ICOS KO Tiere mit NP-OVA/Alum + B. pert. i.p. immunisiert und deren Milzen 12 Tage nach Immunisierung in der Durchflusszytometrie (A) und mit Hilfe der Immunhistologie (B und C) analysiert. Dargestellt in Abbildung A sind repräsentative Durchflusszytometrieanalysen und deren statistische Auswertungen von Keimzentrs-B-Zellen. Zur Analyse von Keimzentren (B) und FDZ

Strukturen (C) bei WT und ICOS KO Tieren wurden sequenzielle Kryoschnitte der Milzen gefertigt und davon 15 Gewebeschnitte, die zufällig ausgewählt wurden, in der Immunhistologie analysiert. Zur Bestimmung von Keimzentren wurde ein Antikörper gegen GL7 (rot) verwendet und die FDZ-Strukturen (rot) wurden angefärbt. Zur Beurteilung der Milzarchitektur wurde eine Kernfärbung (blau) durchgeführt. Die Kryoschnitte wurden mit einer 50fachen Vergrößerung analysiert und abfotografiert. Blaue Symbole repräsentieren die Daten der WT Tiere, rote Symbole die der ICOS KO Tiere.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die verringerte Keimzentrumsentwicklung durch ICOS nicht durch eine mangelnde Formierung der FDZ-Strukturen zurückzuführen ist. Vielmehr führt eine ICOS-Defizienz zu einer erhöhten Anzahl bzw. erhöhten Gesamtfläche der FDZ-Areale, wodurch jedoch die verringerte Keimzentrumsentwicklung nicht kompensiert wird. Es kann jedoch vermutet werden, dass ICOS einen Einfluss auf die Funktion der FDZ im Keimzentrum hat.

3.4.3 Die Keimzentrumsentwicklung im adoptiven T-B Kooperationsmodell

Wie in Abschnitt 3.4.2. erläutert wurde, hat eine ICOS-Defizienz keinen Einfluss auf die FDZ-Formation. Jedoch ist die Frequenz, der CXCR5⁺ Keimzentrums T-Helferzellen stark in ICOS KO Mäusen reduziert. Die verringerte Anzahl der TFH ist die Ursache der mangelnden Keimzentrumsreaktion (Bossaller et. al. 2006). Ob die verringerte Anzahl der TFH oder ein gestörter Kontakt zwischen den Keimzentrums-B-Zellen und den TFH die Ursache für die gestörte Keimzentrumsentwicklung ist, wurde jedoch noch nicht untersucht. Dies sollte jedoch mit Hilfe des adoptiven T-B Transfermodells erfolgen. Durch spezifische Antikörper zur Detektion der transgenen T- und B-Zellen in der Durchflusszytometrie und in der Histologie hat man die Möglichkeit, den Einfluss von ICOS-defizienten T-Helferzellen und deren Funktion auf die Keimzentrumsentwicklung aufzuklären. Dafür wurden transgene OT-2 WT T-Zellen mit transgenen B-Zellen in ICOS KO Rezipienten und OT-2 ICOS KO T-Zellen mit transgenen B-Zellen in ICOS KO Rezipienten transferiert. Nach der Immunisierung wurden die drainierenden Lymphknoten der Rezipienten in der Durchflusszytometrie auf die Frequenz der generierten transgenen Keimzentrums-B-Zellen untersucht. Weiterhin wurden Kryoschnitte der drainierenden Lymphknoten gefertigt und diese in der Histologie untersucht. Die Durchflusszytometrieanalysen zeigten eine deutliche Hochregulation von PNA und GL7 auf transgenen B-Zellen. An Tag 3 nach Immunisierung tragen 36% der transgenen B-Zellen der WT in ICOS KO Gruppe PNA und GL7 auf der Zelloberfläche. Transgene B-Zellen der ICOS KO in ICOS KO Gruppe koexprimieren PNA und GL7 nur zu etwa 15%. Auffällig ist, dass erst GL7 an Tag 2 und an Tag 3 PNA hochreguliert wird. Ob es sich bei diesen frühen Zeitpunkten bei den PNA+GL7⁺ B-Zellen um Keimzentrums-B-Zellen handelt, ist ungewiss, denn diese Marker können auch zur Identifikation von aktivierten B-Zellen verwendet werden. Nach Tag 3 werden beide Marker wieder

herunterreguliert und das Maximum der Keimzentrumsreaktion findet möglicherweise erst an Tag 8 nach Immunisierung statt. An diesem Analysetag sind 10% der transgenen B-Zellen der WT Gruppe positiv für PNA und GL7, in der ICOS KO in ICOS KO Gruppe detektiert man nur etwa 1,5% PNA+GL7+ transgene B-Zellen (Abb. 28).

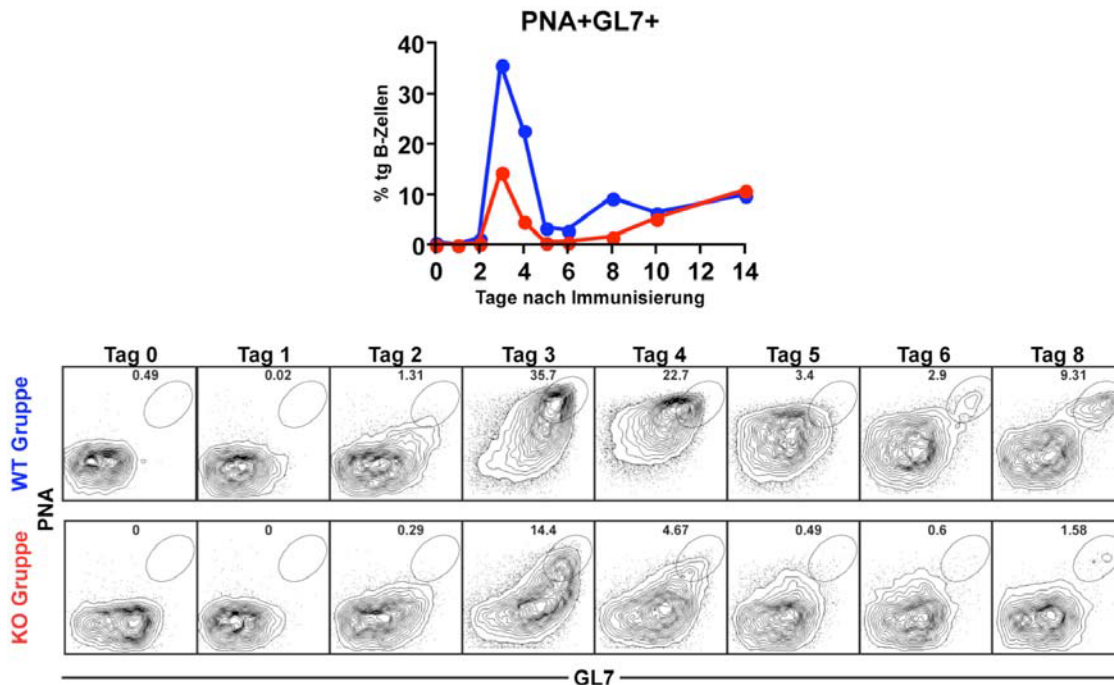


Abb. 28: Der Einfluss von ICOS auf die Keimzentrumsreaktion im adoptiven T-B Kooperationsmodell

Dargestellt sind repräsentative Durchflusszytometrieanalysen und deren Analysen der transgenen Keimzentrums-B-Zellen im adoptiven T-B Transfermodell. Dafür wurden $2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen und 2×10^6 naive transgene OT-2 WT T-Zellen oder OT-2 ICOS KO T-Zellen in ICOS KO Tiere transferiert und diese mit NP-OVA/Alum + B. pert. an der Schwanzbasis immunisiert. Zu jedem Analysetag wurden die drainierenden Lymphknoten von jeweils vier Rezipienten gepoolt. Blaue Symbole in den Graphiken repräsentieren die detektierten, transgenen Keimzentrums-B-Zellen der 1. Transfergruppe (OT-2 WT T-Zellen mit B-Zellen in ICOS KO Mäuse). Die analysierten Keimzentrums-B-Zellen der 2. Transfergruppe (OT-2 ICOS KO T-Zellen mit B-Zellen in ICOS KO Mäusen) sind mit roten Symbolen gezeigt. Mehrfach unabhängig durchgeführte Untersuchungen führten zu gleichen Ergebnissen.

In der Histologie beobachtet man, dass der Großteil der transgenen B-Zellen in die B-Zellfollikel einwandert und zu frühen Zeitpunkten (Tag 4) eine Hochregulation von GL7 auf den transgenen B-Zellen stattfindet. Mit Hilfe der Histologie erkennt man auch, dass sich die CD45.1 Färbung mit der GL7 Färbung an Tag 4 überschneidet. An Tag 6 erkennt man, dass nicht alle CD45.1 gefärbten Zellen noch GL7 exprimieren, sondern diesen Marker herunterreguliert haben (Abb. 28). An der kompakten GL7 Struktur erkennt man aber ein intaktes Keimzentrum, das sich noch nicht in der Auflösungsphase befindet. Daher könnte es sich bei den an Tag 6 mit GL7 markierten transgenen B-Zellen um B-Zellen des Keimzentrums handeln. Die verringerte Ausbildung der Keimzentren bei einer fehlenden ICOS Interaktion im adoptiven T-B Kooperationsmodell kann mit Hilfe der Histologieuntersuchungen nochmals bestätigt werden (Abb. 29A).

3. Ergebnisse

Zudem wurde die mangelnde Differenzierung der transgenen TFH und das Einwandern in die FDZ-Struktur des Keimzentrums in der ICOS KO Gruppe histologisch beobachtet. Antigen-spezifische TFH werden als Thy-1.1 gefärbte Zellen definiert, die sich in der FDZ-Region befinden. Während in der WT Gruppe eindeutig transgene OT-2 WT T-Zellen in Regionen des Keimzentrums einwandern (gekennzeichnet mit Sternsymbolen), die mit der FDZ-Struktur übereinstimmt, detektiert man keinerlei transgene OT-2 ICOS KO T-Zellen im Keimzentrum der ICOS KO Gruppe. Weiterhin kann festgestellt werden, dass an Tag 4 schon transgene OT-2 WT T-Zellen als TFH in die FDZ-Areale des Keimzentrums eingewandert sind (Abb. 29B).

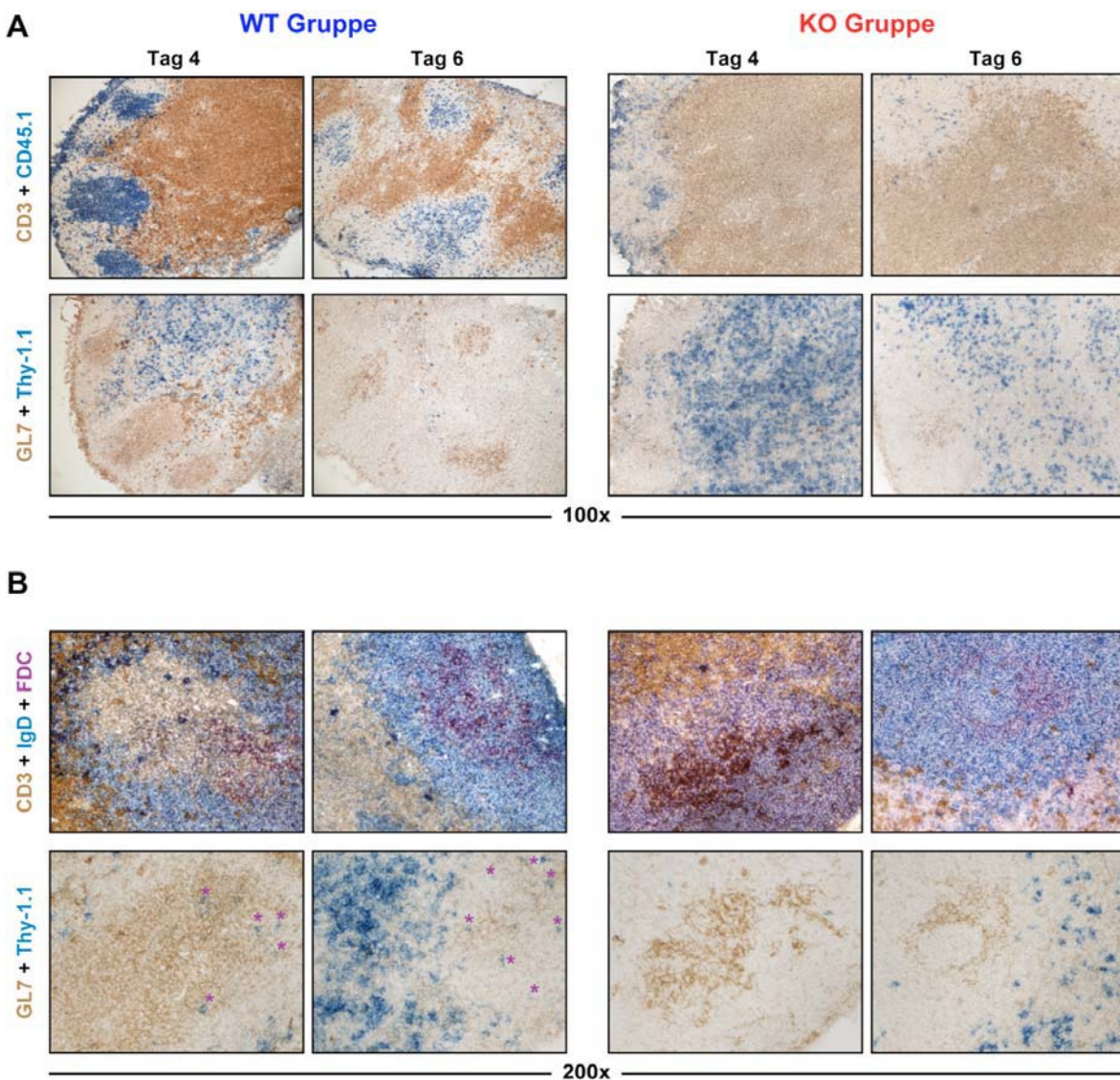


Abb. 29: Die Keimzentrumsreaktion im adoptiven T-B Transfermodell in der Histologie

Mit Hilfe der Immunhistologie wurden die Keimzentrums-B-Zellen und die TFH im adoptiven T-B Transfer untersucht. Dafür wurden $2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen und 2×10^6 naive transgene OT-2 WT T-Zellen oder OT-2 ICOS KO T-Zellen in ICOS KO Tiere transferiert und diese mit NP-OVA/Alum + B. pert. an der Schwanzbasis immunisiert. An den gezeigten Analysetagen wurden von den drainierenden Lymphknoten der Rezipienten Kryoschnitte gefertigt. Die transferierten T- und B-Zellen wurden in der Immunhistologie mit Hilfe von Thy-1.1 und CD45.1 (blau) detektiert. Die Keimzentren wurden mit Hilfe des Oberflächenantigens GL7 (braun) angefärbt. Zur Charakterisierung der Lymphknotenarchitektur wurden die B-Zellareale mit IgD (braun) markiert. Zur Analyse der TFH und deren Lokalisierung im Keimzentrum wurden transgene T-Zellen mit Thy-1.1 (blau) und die Keimzentren über GL7 (braun)

detektiert. Auf zusätzlichen Kryoschnitten wurde die T-Zellzone mit CD3 (braun), die B-Zellzone mit IgD (blau) und die FDZ-Region (magenta) angefärbt. Die dargestellten Kryoschnitte sind mit einer 100fachen bzw. 200fachen Vergrößerung abfotografiert worden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine ICOS-Defizienz verhindert, dass T-Zellen zu follikuläre T-Helferzellen differenzieren und in FDZ-Strukturen der Keimzentren einwandern. Die Abwesenheit von TFH führt wiederum zu einer verminderten Keimzentrumsbildung. Damit wurde mit Hilfe eines adoptiven T-B Transfermodells gezeigt, dass ein Kontakt zwischen TFH und Antigen-spezifischen B-Zellen neben den FDZ nötig ist, um die Keimzentrumsreaktion zu regulieren und zu erhalten. Die Induktion einer Keimzentrumsreaktion scheint durch die Interaktion von B-Zellen und FDZ in den FDZ-Arealen zu erfolgen und ist T-Zellunabhängig. Somit kann auch im adoptiven T-B Kooperationsmodell die Effekte einer ICOS-Defizienz auf die Keimzentrumsentwicklung und Differenzierung zu TFH bestätigt werden.

3.5 Die Rolle von ICOS auf die Plasmazellreaktion

Neben der Keimzentrumsentwicklung spielt ICOS auch eine große Rolle bei der Plasmazellreaktion. Studien mit ICOS bzw. ICOS-L defizienten Mäusen zeigten nach Immunisierung und vor allem in der Sekundärantwort verringerte Immunglobulinspiegel. (Dong et al., 2001b). Mäuse, mit einer ICOS-L Überexpression zeigen eine erhöhte Ig-Sekretion (Yoshinaga et al., 1999). Jedoch sind die möglichen Mechanismen dieser Ergebnisse noch nicht geklärt. Weiterhin ist noch völlig unklar, welche Rolle die ICOS-Interaktion bei der T-B Kooperation während der Plasmazellreaktion spielt. Daher sollen mit Hilfe von weiteren Analysen mit WT und ICOS KO Mäusen neue Erkenntnisse über die Rolle von ICOS bei der Ig-Sekretion gewonnen werden. Das adoptive T-B Transfermodell ermöglicht es, den Einfluss von ICOS-defizienten T-Zellen und deren Funktion auf die Plasmazellreaktion genauer zu untersuchen.

3.5.1 Die Plasmazellreaktion in C57BL/6 WT und ICOS KO Mäusen

Als erstes wurde die Frequenz der generierten CD138⁺ Plasmazellen in WT und ICOS KO Tieren analysiert. Dafür wurden die Mäuse im Abstand von vier Wochen viermal mit NP-OVA/Alum + B. pert. i.p. immunisiert und die Milzen in der Durchflusszytometrie untersucht. WT Mäuse zeigen nach 12 Tagen der letzten Immunisierung eine Frequenz von etwa 1,7% CD138⁺ Plasmazellen. Eine ICOS-Defizienz führt zu einer signifikant geringeren Frequenz von CD138⁺ Plasmazellen und es konnten in der Durchflusszytometrie nur ca. 0,8% CD138⁺ Plasmazellen detektiert werden (Abb. 30A).

3. Ergebnisse

Zur Bestimmung der Ig-Serumantikörper wurde den Mäusen am gleichen Analysetag Blut abgenommen und das gewonnene Serum in ELISA-Tests auf unterschiedliche Ig-Klassen untersucht. Für die Analyse der niedrig affinen bzw. hoch affinen NP-spezifischen Serumantikörpern wurden Proteine beim Plattencoat verwendet, die in unterschiedliche Mengen an NP gekoppelt waren. Bei Serumantikörpern, die mit hoch substituierten NP-Proteinen (NP28) detektiert wurden, handelt es sich um alle NP-spezifischen Serumimmunglobuline. Hoch affine Serumantikörper hingegen binden an das niedrig substituierte NP-Protein (NP3).

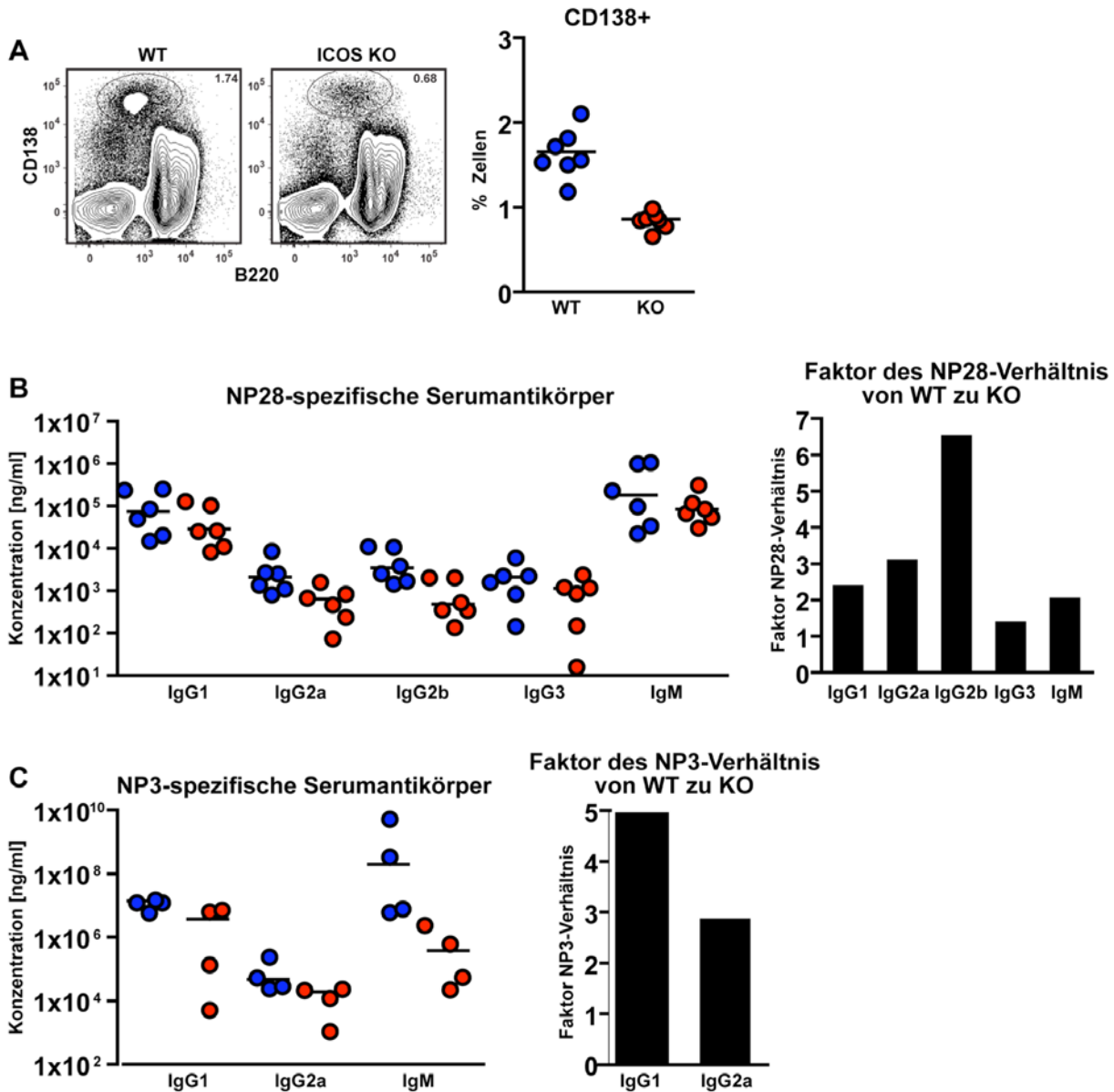


Abb. 30: Die Rolle von ICOS auf die Plasmazellreaktion

Zur Analyse der Plasmazellreaktion wurden WT und ICOS KO Tiere dreimal im Abstand von 4 Wochen mit NP-OVA/Alum + B. pert. i.p. immunisiert und deren Milzen 12 Tage nach Immunisierung in der Durchflusszytometrie analysiert (A). Gewonnene Serumproben an diesem Analysetag wurden im ELISA auf NP28-spezifische Serumantikörperklassen (B) bzw. NP3-spezifische Serumantikörperklassen (C) untersucht. Jedes blaue Symbole zeigt ein WT Tier, die roten Symbole repräsentieren ICOS KO Tiere. Zusätzlich zeigt die Statistik den Faktor des NP28- bzw. NP3-Verhältnis von WT zu KO Tieren.

Folgende NP28-spezifische Ig-Klassen wurden im Mausserum in ansteigender Konzentration gemessen: IgG3, IgG2a, IgG2b, IgG1 und IgM. Die statistische Auswertung der ELISA-Daten zeigte eindeutig, dass eine ICOS-Defizienz zur verringerten Serumspiegel aller NP-spezifischen Ig-Klassen führt. WT Mäuse besitzen um einen Faktor 2 höheren IgM und IgG1 NP-spezifischen Serumspiegel als ICOS KO Tiere. Die gemessene Konzentration von allen NP-spezifischen IgG2a und IgG2b Serumspiegel ist in der WT Gruppe sogar um Faktor 3 bzw. Faktor 6 höher als bei KO Mäusen (Abb. 30B). Weiterhin führt die ICOS-Defizienz zur verringerten Serumspiegel der hoch affinen NP3-spezifischen IgG1 Klassen. Die gemessene Konzentration von NP3-spezifischen IgG1 Antikörpern im Mausserum unterscheidet sich zwischen WT und ICOS KO Mäusen um den Faktor 5, bei den NP3-spezifischen IgG2a Serumspiegel ist es nur ein Faktor 3 und damit identisch zum NP28-ELISA (Abb. 30C). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine ICOS-Defizienz zu einer verringerten Plasmazellfrequenz und Serum Ig-Konzentration führt.

3.5.2 Die Plasmazellreaktion im adoptiven T-B Transfermodell

Studien mit Hilfe von WT und ICOS KO Mäusen zeigten, dass eine ICOS-Defizienz neben der geringeren Plasmazellfrequenz und verringerten Konzentration der Serumimmunglobuline auch zu einer verringerten Sekretion von Serumimmunglobulinen durch affinitätsgereifte B-Zellen führt. In wieweit eine T-B Interaktion bei der Plasmazellreaktion eine Rolle spielt, soll mittels des adoptiven T-B-Transfermodells untersucht werden. Damit ist es möglich, den Einfluss von ICOS bei der spezifischen Interaktion von T- und B-Zellen in der Plasmazellreaktion genauer aufzuklären.

Dafür wurden transgene OT-2 WT T-Zellen mit transgenen B-Zellen in ICOS KO Rezipienten und OT-2 ICOS KO T-Zellen mit transgenen B-Zellen in ICOS KO Rezipienten transferiert. Nach der Immunisierung wurden die drainierenden Lymphknoten der Rezipienten in der Durchflusszytometrie auf die Frequenz der generierten CD138⁺ Plasmazellen analysiert. Die Daten der Durchflusszytometrie zeigten eine deutliche Hochregulation von CD138 auf transgenen B-Zellen an Tag 2. Zu diesem frühen Zeitpunkt handelt es sich jedoch nicht um Plasmazellen. Vielmehr scheint es, dass die Mehrzahl der transgenen B-Zellen als Zeichen einer Aktivierung CD138 hochregulieren. Denn zum Tag 3 erreicht der MFI-Wert von CD138 seinen Startwert wieder. Weiterhin ist erst zum Tag 4 eine abgetrennte CD138^{high} B-Zellpopulation zu erkennen, die als Plasmazellen definiert werden kann. Auch im adoptiven T-B Transfermodell ist die geringere Plasmazellfrequenz bei einer ICOS-Defizienz zu beobachten. Denn mehr als 1,5% der transgenen B-Zellen der WT Gruppe tragen CD138 in einem hohen Niveau auf der Zelloberfläche. Transgene B-Zellen der ICOS KO Gruppe exprimieren CD138^{high} nur zu etwa 0,4% (Abb. 31A).

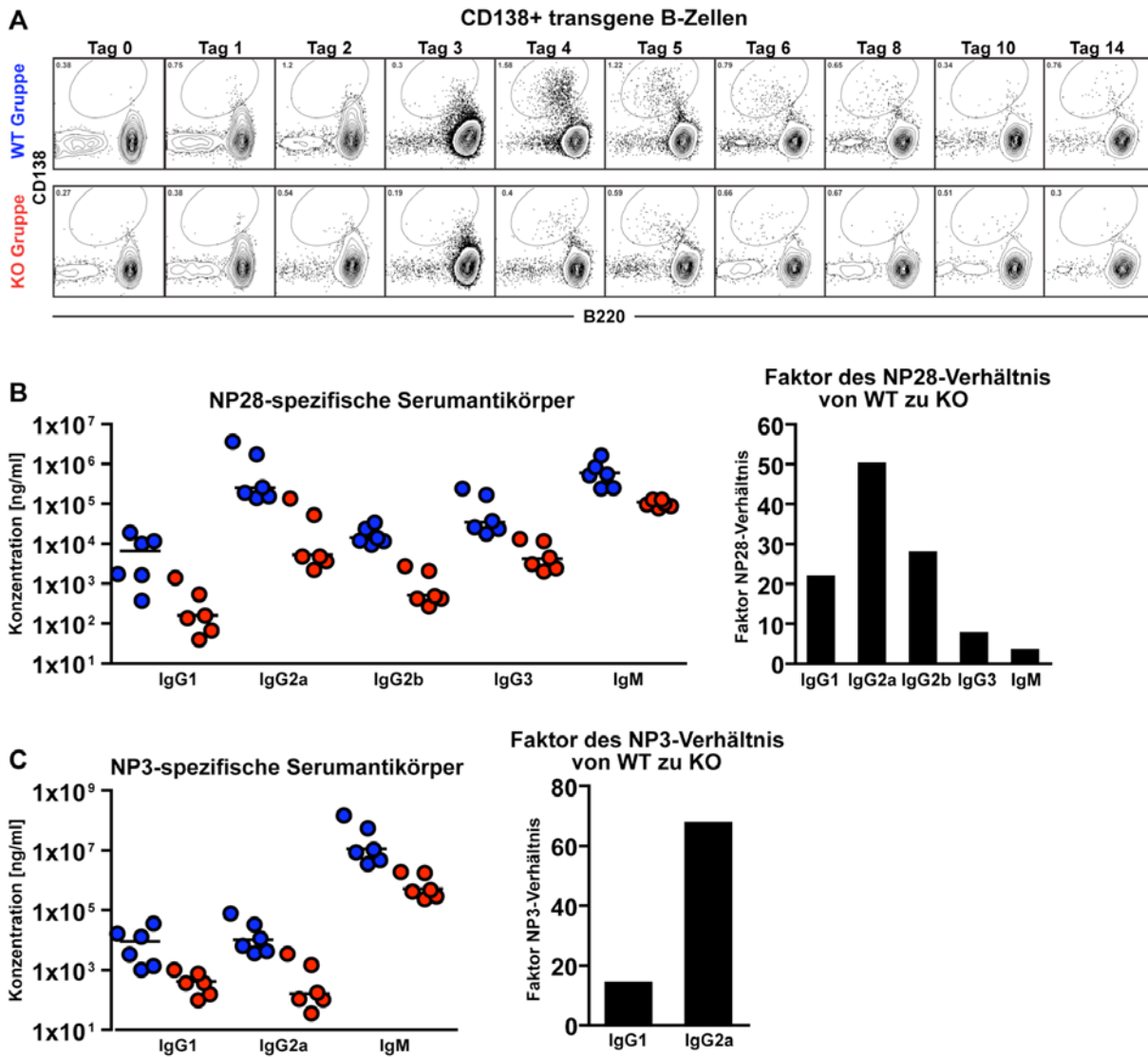


Abb. 31: Die Rolle von ICOS auf die Plasmazellreaktion im adoptiven T-B Transfermodell

Dargestellt sind repräsentative Durchflusszytometrieanalysen und deren statistischen Analysen der transgenen Plasmazellen im adoptiven T-B Transfermodell (A). Dafür wurden $2,5 \times 10^6$ transgene B-Zellen und 2×10^6 naive transgene OT-2 WT T-Zellen oder OT-2 ICOS KO T-Zellen in ICOS KO Tiere transferiert und diese mit NP-OVA/Alum + B. pert. an der Schwanzbasis immunisiert. Zu jedem Analysetag wurden die drainierenden Lymphknoten von jeweils vier Rezipienten gepoolt. Blaue Symbole in den Graphiken repräsentieren die detektierten, transgenen Plasmazellen der 1. Transfergruppe (OT-2 WT T-Zellen mit B-Zellen in ICOS KO Mäuse). Die analysierten Plasmazellen der 2. Transfergruppe (OT-2 ICOS KO T-Zellen mit B-Zellen in ICOS KO Mäusen) sind mit roten Symbolen gezeigt. Zusätzlich wurde den Rezipiententieren an Tag 8 Blut entnommen und die gewonnenen Serumproben im ELISA auf NP28-spezifische Serumantikörperklassen (B) bzw. NP3-spezifische Serumantikörperklassen (C) untersucht. Weiterhin zeigt die Statistik den Faktor des NP28- bzw. NP3-Verhältnis von WT zu KO Tieren. Jedes blaue Symbole zeigt ein Rezipiententier, dass OT-2 WT T-Zellen mit B-Zellen, erhalten hat. Die roten Symbole repräsentieren Rezipiententiere, denen transgene OT-2 ICOS KO T-Zellen mit B-Zellen transferiert wurden.

Zur Bestimmung der Ig-Serumantikörper wurde den Rezipienten der WT und ICOS KO Gruppe am 8. Analysetag Blut abgenommen und das gewonnene Serum in ELISA-Tests auf unterschiedliche NP28- bzw. NP3-spezifische Ig-Subklassen untersucht. Bei den NP28-spezifischen Immunglobulin Subklassen wurde die Reihenfolge der ansteigenden Konzentration wie folgt gemessen: IgG1, IgG2b, IgG3 IgG2a und IgM. Auch hier zeigte die statistische Auswertung der ELISA-Daten

eindrucksvoll, dass eine ICOS-Defizienz zur verringerten Serumspiegel aller NP-spezifischen Antikörper der Ig-Klassen führt. Rezipienten der WT Gruppe haben einen um Faktor 5 höheren IgM und um einen Faktor 9 höheren IgG3 Serumspiegel. Die gemessene Konzentrationen von allen NP-bindenden IgG1 und IgG2b sind in der WT Gruppe sogar um Faktor 23 bzw. Faktor 29 höher als bei ICOS KO Gruppe. Besonders deutlich ist der ICOS-Effekt bei der IgG2a Konzentration aller NP-bindenden Ig. Der Transfer von OT-2 WT T-Zellen führt dazu, dass im Serum der Rezipienten 50 mal mehr IgG2a Ig detektiert werden können als bei Rezipienten der ICOS KO Gruppe (Abb. 31B). Die Analyse der Serumspiegel der NP3-spezifischen Ig-Subklassen zeigt im adoptiven T-B Kooperationsmodell, dass eine fehlende ICOS-Interaktion zwischen spezifischen T- und B-Zellen zu einer verringerte Menge der hoch affinen NP3-spezifischen IgG2a Klasse führt.

Die gemessene Konzentration von hoch affinen NP3-spezifische IgG2a-Antikörper im Mausserum der Rezipienten unterscheidet sich zwischen der WT Gruppe und ICOS KO Gruppe um Faktor 69. Bei den NP3-spezifischen IgG1 Serumspiegel beobachtet man zwischen den beiden Gruppen einen Unterschied um nur einen Faktor 16, der unter dem zum NP28-ELISA liegt (Abb. 31C).

Die gewonnenen Erkenntnisse zur Plasmazellreaktion im adoptiven T-B Transfermodell korrelieren mit den Ergebnissen im Abschnitt 3.5.1. Die Untersuchungen mit Hilfe des adoptiven T-B Kooperationsmodells zeigen, dass eine Interaktion zwischen NP-spezifischen T- und B-Zellen über ICOS nötig ist, damit eine vollständige Plasmazellreaktion stattfindet. Fehlt diese Kostimulation, so führt dies zu einer verringerten Plasmazellfrequenz und Serum Ig-Konzentration. Im adoptiven T-B Transfermodells konnte auch beobachtet werden, dass eine ICOS-Defizienz möglicherweise zu einem Defekt bei der Affinitätsreifung führen könnte.

4 Diskussion

4.1 Etablierung eines adoptiven *in vivo* Transfersystems

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erfolgreich ein *in vivo* T-B Kooperationssystem entwickelt mit dem es möglich ist, die Interaktion zwischen Antigen-spezifischen T- und B-Zellen in frühen Phasen der Immunantwort zu beobachten. Dabei konnten die T-Zell-abhängige B-Zellexpansion und alle wesentlichen Schritte der B-Zelldifferenzierung untersucht werden. Ein großes Augenmerk wurde auf die T-Zell-abhängige B-Zellaktivierung, sowie auf die Keimzentrums- und Plasmazellreaktion gelegt. Dieser Abschnitt fasst die Vorteile unseres adoptiven Transfermodells gegenüber einigen bereits in der Literatur beschriebenen Systemen zusammen und vergleicht die gewonnenen Daten mit den bekannten T-B Kooperationssystemen.

In unseren adoptiven Transferexperimenten wurden als Donoren für transgene B-Zellen die im Labor von Klaus Rajewsky entwickelten B1-8i Mäuse (Sonoda et al., 1997) verwendet. Der B1-8 BZR ist spezifisch für NP bei der Paarung einer schweren Kette mit einer λ leichten Kette. Da es sich um BZR Knockin Mäuse handelt, sind deren B-Zellen in der Lage auch einen Ig-Klassenwechsel durchzuführen. Zusätzlich wurde die Frequenz der transgenen B-Zellen durch eine Kreuzung mit CkT Mäusen (Knockout Mäusen für die κ leichte Kette) erhöht (Zou et al., 1993).

In der Literatur sind mehrere Mausstämme beschrieben, die transgene BZR besitzen und auch als Donortiere für adoptive Transfermodelle verwendet wurden. 1996 veröffentlichte Cascalho et al. ihre Untersuchungen der QM Maus (quasi-monoclonal mouse; Cascalho et al., 1996). Die Maus besitzt rearrangierte VDJ-Segmente im Ig schweren Ketten Locus (Knockin für eine hypermutierte Variante von V_H186) und keine funktionalen κ leichte Ketten. Die NP-Spezifität des BZR dieser Maus wird durch die Paarung einer schweren Kette mit einer beliebigen λ leichten Kette gewährleistet. Das primäre Repertoire des BZR ist monospezifisch; bei der somatischen Hypermutation oder beim sekundären Rearrangieren (Rezeptor-Editing) des BZR verändert sich die Spezifität zu NP um 20%, d. h. die NP-Spezifität geht mit zunehmenden Alter verloren. Ein Klassenwechsel vom IgM Isotyp zu anderen Isotypen ist in der QM Mäuse zu beobachten. Tendenziell aber kann eine erhöhte IgG2a und IgA Isotypkonzentration nachgewiesen werden. Der größte Nachteil dieser Maus ist, dass nur weniger als die Hälfte der IgM und keine der anderen Isotypen NP binden können. Eine T-Zell-unabhängige Keimzentrumsformation konnte jedoch beobachtet werden (de Vinuesa et al., 2000).

Shih et al. züchteten zwei transgene Mausstämme, deren BZR in unterschiedlicher Affinität NP binden können. Eine Mutation einer Aminosäure führt dazu, dass der BZR dieser B1-8^{hi} Mäuse NP 40mal stärker binden kann als normal. Eine verminderte NP-Affinitätsbindung bei B1-8^{lo} Mäusen

wurde durch eine Mutation von vier Aminosäuren erreicht. In beiden Mausstämmen können nur 3-5% der B-Zellen NP binden, bei einer Kombination der schweren Kette mit einer κ leichten Kette ist eine NP-BZR-Bindung nicht möglich. Auch in unseren B1-8i Mäuse konnten zuerst nur B-Zellen in dieser Frequenz NP binden, eine Kreuzung mit CkT Tieren führte jedoch zu einer Erhöhung dieser B-Zellfrequenz. Bei einer T-Zell-unabhängigen Antikörperantwort konnte festgestellt werden, dass die B-Zellexpansion und die Frequenz der Keimzentrums- und CD138⁺ B-Zellen der B1-8^{lo} Mäuse zweimal geringer ausfiel als bei B1-8^{hi} Mäusen. In Konkurrenzexperimenten (gleichzeitige Gabe von B1-8^{hi} und B1-8^{lo} B-Zellen, die um das Antigen konkurrieren) zeigten nur die hoch affinen B-Zellen eine Immunantwort (Shih et al., 2002a). Bei einer T-Zell-abhängigen Immunantwort postulierten die Autoren, dass es keinen Unterschied zwischen hoch affinen und niedrig affinen B-Zellen bei der intrinsischen Kapazität der Antigenantwort gibt. Jedoch ist die Analyse der Keimzentrums-B-Zellen in der Durchflusszytometrie fraglich, da auch GL7⁺ B-Zellen in die Auswertung mit einbezogen wurden. Es scheint jedoch, dass bei B1-8^{lo} Mäuse weniger Keimzentrums-B-Zellen detektiert werden können als bei B1-8^{hi} Mäusen. Konkurrenzexperimente zeigten, dass nur die hoch affinen B-Zellen im Keimzentrum akkumulieren aber weniger somatische Hypermutation bei diesen B-Zellen nachgewiesen werden können (Shih et al., 2002b). Die NP-Affinität der B-Zellen unserer B1-8i Mäuse liegt in etwa zwischen der von B1-8^{lo} und B1-8^{hi} Mäusen.

Weiterhin sind in der Literatur mehrere Modelle gezeigt, mit denen man die Interaktion von T- und B-Zellen in einer frühen Immunantwort untersucht hat. So veröffentlichte erstmalig 1998 Paul Garside seine Studien über die frühen Phasen der Immunantwort und deren T-B Kooperation mit Hilfe seines entwickelten adoptiven Transfersystems mit transgenen T- und B-Zellen (Garside et al., 1998). Zur Analyse z. B. einer Keimzentrumsreaktion ist dieses System aber unzureichend, da die verwendeten transgenen B-Zellen keinen Ig-Klassenwechsel durchführen können. Dieses Problem löste Pape et al. 2003 indem sie für ihr adoptives T-B Transfermodell Antigen-spezifische Donor-B-Zellen aus einer BZR Knockin Maus benutzten (Pape et al., 2003). Diese B-Zellen sind in der Lage, die Ig-Klassenwechsel durchzuführen. Doch reagieren sie gegen verschiedene Formen von H-2K und somit auch gegen die H-2K^d der verwendeten Rezipienten. Ein weiterer Nachteil dieses Systems ist, dass das zur Immunisierung verwendete Mimotop Peptid auch eine T-Zell-unabhängige B-Zellantwort hervorruft. 2007 veröffentlichte Pape et al. ein überarbeitetes adoptives T-B Transfermodells, bei dem sie transgene TEa TZR Rag-defiziente und anti-HEL Knockin Mäuse als Donortiere verwendeten. Eine T-Zell-abhängige Immunantwort erreichten sie durch eine Immunisierung mit E α GFP-HEL mit 2 μ g LPS als Adjuvans, die 24 h nach adoptivem Transfer intradermal ins Ohr verabreicht wurde (Pape et al., 2007). Allen et al. etablierten 2007

ebenfalls ein adoptives T-B Transfermodell, bei dem sie anti-HEL Knockin und OT-II Mäuse als Donortiere verwendeten (Allen et al., 2007). Zur Generierung der transgenen BZR Donortiere wurde eine Kreuzung aus VDJ_H Knockin Mäusen und $\kappa 5$ leichte Kette Mäusen unternommen, die, wie in unserem System, zu einer Erhöhung der HEL-spezifischen transgenen B-Zellen der Donoren führt. Zur Immunisierung der Rezipienten wurde DEL-OVA oder HEL-Ova mit einem Adjuvans subkutan verabreicht wodurch eine T-Zell-abhängige Immunantwort ausgelöst wird. Die geringere Affinität des BZRs zu DEL konnte von Nutzen sein, wenn eine primäre Immunantwort imitiert werden soll. Diese adoptiven T-B Transfermodelle dienen als Vergleichsmöglichkeiten mit unseren etablierten T-B Transfersystem.

Das Kinetikmuster der klonalen T- und B-Zellexpansion des Garside T-B Transfermodells ist mit unserem vergleichbar, wenn auch zeitlich um einen Tag verzögert. Die T-Zellexpansion erreicht an Tag 4 nach Immunisierung ihr Maximum und fällt bis zum Tag 7 wieder ab. Auch die charakteristische Schulter des Graphen an Tag 5 und Tag 6, der die T-Zellexpansion beschreibt, ist auch unserem System zu beobachten. Die B-Zellexpansion erreicht an Tag 5 ihr Maximum und erreicht schon 7 Tage nach Immunisierung einen geringen Wert. Spätere Analysewerte wurden durch Garside et al. nicht unternommen. Auch die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen zur Migration der transgenen T- und B-Zellen des Garside oder Pape T-B Transfermodells sind mit unseren identisch. Die transgenen T-Zellen sind erst in der T-Zellzone verteilt und wandern dann nach Immunisierung an den Rand der B-Zellfollikel. Einige T-Zellen sind auch im B-Zellfollikel zu detektieren. Die transgenen B-Zellen befinden sich im B-Zellfollikel und formieren sich nach einer Immunisierung zu kleinen Anhäufungen. Das Garside Modell zeigt, dass an Tag 4 eine Kolokalisierung dieser kompakten B-Zellstrukturen mit PNA gefärbten Keimzentrumsstrukturen zu beobachten ist. Bei Allen et al. ist am Maximum der B-Zellexpansion die Kolokalisierung der transgenen B-Zellen und der GL7 positiven Keimzentrumsstruktur an Tag 7 nach Immunisierung zu erkennen (Allen et al., 2007). Auch wir beobachten an Tag 4 die größten GL7⁺ Areale im B-Zellfollikel. Eine Keimzentrumsformation zu einem solch frühen Zeitpunkt ist jedoch äußerst ungewöhnlich, denn normalerweise wird das Maximum der Keimzentrumsreaktion erst an Tag 8 bis Tag 12 nach Immunisierung erwartet. Garside et al. diskutieren diesen Befund in ihrer Veröffentlichung nicht. Die Durchflusszytometrieanalyse zeigt, dass die Keimzentrumsmarker PNA und GL7 an Tag 4 eher als Aktivierungsmarker fungieren, denn ihre Expression wird anschließend wieder herunterreguliert. Ob es sich aber an Tag 4 schon um „echte“ Keimzentren handelt, könnte nur eine Analyse der Affinität des BZRs klären. Keimzentrums-B-Zellen unterliegen einer somatischen Hypermutation, die zu einer Erhöhung der BZR-Affinität zum Antigen führt. Daher müsste der BZR NP in einer höheren Affinität binden. Ist dies an Tag 4 schon der Fall, kann man

davon ausgehen, dass es sich wirklich bei den PNA+GL7+ transgenen B-Zellen um Keimzentrums-B-Zellen handelt. Durchflusszytometrische Untersuchungen zur NP-Spezifität des BZR konnten aber zu keiner Aufklärung führen. Eine mögliche Herunterregulation des BZR oder eine blockierte Bindungsstelle mit NP, verursacht durch die Immunisierung, führt zu einer Abnahme des MFI-Wertes für NP. Eine kompakte GL7 Struktur in der Histologie könnte aber auch ein Indiz für ein „echtes“ Keimzentrum sein, dass man an Tag 6 beobachten kann. Eine Auflösungsphase ist in der Histologie zu diesem Zeitpunkt noch nicht erkennbar und ein weiteres Maximum an PNA+GL7+ transgenen B-Zellen in der Durchflusszytometrie legen die Vermutung nahe, dass man an Tag 4 noch nicht von einer „echten“ Keimzentrumsreaktion sprechen kann. Pape et al. beobachteten in der Durchflusszytometrie, dass man zehn Tage nach Immunisierung IgG2a klassengewechselte GL7 und CD38 positive B-Zellen in den Rezipienten detektieren kann (Pape et al., 2003). Aber nur eine genaue Untersuchung der BZR-Affinität zum Antigen kann zu einer genauen Aussage führen, wann das Maximum der Keimzentrumsreaktion in unseren T-B Transfermodell stattfindet. Daher sollten Sequenzierungen der schweren Kette Segmente und Untersuchungen zur somatischen Mutationen der CDR Regionen der transgenen B-Zellen über den Zeitraum der vermuteten Keimzentrumsreaktion erfolgen, um den Zeitpunkt der eigentlichen Keimzentrumsreaktion zu bestimmen.

Neben der Keimzentrumsreaktion untersuchte Pape et al. in ihrem T-B Transfermodell die Produktion von Antikörper-produzierendenn Plasmazellen. In der Durchflusszytometrie konnten 5 Tage nach Immunisierung Plasmazellen identifiziert werden. Der Ig-Klassenwechsel der transgenen B-Zellen wurde auch im Serum der Donortiere untersucht. Während die IgM Serumtiter 4 Tage nach Immunisierung schon wieder abnehmen, ist das Maximum an gemessenen IgG2a Serumtiter an Tag 6 zu messen. Der Serumspiegel dieser Ig-Subklasse bleibt noch für weitere vier Tage bestehen, während der IgM Serumspiegel seinen Ausgangswert 10 Tage nach Immunisierung erreicht hat. Bei einem Transfer von TZR α KO T-Zellen konnten keine Serum-Ig mit Klassenwechsel nachgewiesen werden (Pape et al., 2003). Der Ig-Klassenwechsel, Affinitätsreifung und somatische Hypermutation der transgenen B-Zellen wurden von Allen et al. ebenfalls untersucht. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten sie feststellen, dass 7 Tage nach Immunisierung ein Ig-Klassenwechsel zu IgG2a und IgG2b stattgefunden hat, ein Ig-Klassenwechsel zu IgG1 konnte nicht beobachtet werden. Ein erneuter Ig-Klassenwechsel zu IgG2b konnte bei der Mehrheit der klassengewechselten transgenen B-Zellen 14 Tage nach Immunisierung nachgewiesen werden. Ein Klassenwechsel zu anderen Ig-Subklassen konnte auf Grund von mangelnder Reagenzverfügbarkeit nicht zuverlässig geprüft werden. Weiterhin konnte eine erhöhte BZR-Affinität zu DEL nachgewiesen werden. Die Sequenzierung der schweren Kette

Segmente zeigten eine gesteigerte Anzahl von somatischen Mutationen der transgenen B-Zellen. An Tag 14 konnte in der CDR2 Region eine erhöhte Frequenz an Austauschmutation beobachtet werden (Allen et al., 2007).

In unserem T-B Transfersystem konnten CD138+ transgene B-Zellen in der Durchflusszytometrie zwischen dem dritten und fünften Tag nach Immunisierung detektiert werden, wobei das Maximum der CD138+ transgenen B-Zellen an Tag 4 gemessen wird. Wie auch Pape et al. haben wir mit den Ig-Klassenwechsel der transgenen B-Zellen im Serum der Donortiere bestimmt. Das Maximum der Serumspiegel der einzelnen Ig-Subklassen ist 8 Tage nach Immunisierung erreicht. Eine dramatische Abnahme der IgM-Ig wie bei Pape et al. konnten wir nicht beobachten. Weiterhin konnte feststellen, dass ein Klassenwechsel zu allen Subklassen stattfindet, wobei ein Ig-Klassenwechsel zur IgG1-Subklasse verringert stattfindet. Jedoch konnten wir im Serum nicht beobachten ob sich über die Zeit das Verhältnis der einzelnen Ig-Subklassen zueinander verändert und ein Klassenwechsel von IgG2a zu IgG2b stattfindet (Daten nicht gezeigt). Wie bei Allen et al., steuert die Mehrzahl unserer transgenen B-Zellen die Keimzentren an. Dies liegt an der niedrigen BZR-Affinität zu NP, die zur Differenzierung zur Keimzentrums-B-Zelle führt und eine Reifung zur extrafollikulären Plasmazelle verringert (Le et al., 2008).

4.2 Der Einfluss von ICOS auf die B-Zellen

4.2.1 Der Einfluss von ICOS bei frühen Phasen der T-B Kooperation

Ursprünglich wurden ICOS KO Mäusen mit einem Phänotyp beschrieben, der sich nicht von nicht immunisierten Kontrollmäusen unterscheidet. Erst bei einer Immunantwort konnte entdeckt werden, dass eine ICOS-Defizienz zu einer gestörten T-Effektorzellfunktion führt (Dong et al., 2001a; McAdam et al., 2001; Tafuri et al., 2001). Genauere Untersuchungen der T-Zellsubpopulationen zeigten jedoch, dass auch nicht immunisierte ICOS KO Mäuse eine deutlich geringere Anzahl an Effektor-Gedächtnis-T-Zellen und regulatorische T-Zellen besitzen, wodurch vermutet wird, dass ICOS eine große Rolle bei der Homöostase regulatorischer T-Zellen in der Peripherie spielt (Burmeister et al., 2008). Mit Hilfe der ersten *in vitro* Untersuchungen wurde vermutet, dass eine ICOS-Kostimulation einen weit gefächerten Effekt auf die T-Zellaktivierung hat. Die Hochregulation diverser Oberflächenmarker, wie z.B. CD25, CD69 oder CD40L, eine erhöhte Zytokinsynthese, die T-Zellproliferation und das Überleben der T-Zellen sollte über eine ICOS-Kostimulation beeinflusst werden (Hutloff et al., 1999; Yoshinaga et al., 1999; Coyle et al., 2000; McAdam et al., 2001; Tafuri et al., 2001). *In vitro* Untersuchungen von Lymphozyten aus ICOS KO und ICOS-L KO Mäusen zeigten jedoch keinen Einfluss von ICOS auf Zellproliferation

(McAdam et al., 2001; Mak et al., 2003) oder auf das T-Zellüberleben (Mak et al., 2003). Die Verwendung von Antigen-spezifischen T-Zellen in einem adoptiven Transfersystem ermöglichte es, den Einfluss von ICOS auf die T-Zellbiologie *in vivo* genauestens zu untersuchen. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine ICOS-Kostimulation sich nicht auf die Regulation diverser Oberflächenmarker und somit auch nicht auf den Aktivierungsstatus der T-Zellen auswirkt (Burmeister et al., 2008).

In wieweit sich ICOS in den frühen Phasen der Immunantwort auf die B-Zellbiologie *in vivo* auswirkt, konnte mit Hilfe unseres adoptiven T-B Transfermodells erstmalig untersucht werden. Dabei wurden transgene OT2-WT oder OT2 ICOS KO T-Zellen zusammen mit transgenen B1-8i B-Zellen in ICOS KO Rezipienten transferiert. Generell bietet ein adoptives Transfermodell den Vorteil, dass die Startfrequenzen der transferierten Zellen sich nicht zwischen den zu untersuchenden Gruppen unterscheiden. Die ICOS-Kostimulation hat auch bei einem Kotransfer von Antigen-spezifischen, transgenen B-Zellen keinen Einfluss auf die frühe T-Zellaktivierung (Abb. 22A und Abb. 22B). Der Einfluss von ICOS auf das Überleben der Antigen-erfahrenen T-Zellen in späten Phasen der Immunantwort konnte nachgewiesen werden. Während also in den frühen Phasen der Immunantwort die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen nicht durch ICOS beeinflusst wird, ist die T-Zell-abhängige Aktivierung der B-Zellen durch ICOS reguliert. Die ICOS-abhängige Regulation von diverser Aktivierungsmarker (CD23, CD25, CD38, CD69, CD54) zeigt deutlich, dass B-Zellen stärker aktiviert werden, wenn eine T-B-Zellinteraktion über ICOS stattfindet. Neben der stärkeren Aktivierung der B-Zellen durch eine ICOS-Interaktion wurde auch eine stärkere Expansion der B-Zellen festgestellt. Die stärkere Expansion der B-Zellen im Vergleich zur KO Gruppe kann jedoch nicht durch eine verringerte Anzahl apoptotischen B-Zellen erklärt werden. Eine ICOS-Defizienz resultiert nur in einer mäßigen B-Zellproliferation, die durch einen verringerten BrdU-Einbau und die mangelnde Hochregulation von Proliferationsmarkern, wie CD24 und CD25 auf den B-Zellen in der ICOS KO Gruppe bestätigt wurde. Die deutliche Hochregulation von BAFF-R auf B-Zellen der WT Gruppe zeigt auch, dass eine ICOS-Interaktion zur Regulation von Faktoren benötigt werden, die das Überleben der B-Zellen sichert. Durch Hochregulation von CD95 oder TACI bei einer ICOS-Interaktion unterliegen B-Zellen zusätzlichen Kontrollfaktoren. Eine Stimulation dieser Oberflächenmoleküle kann zur Einleitung der Apoptose führen, wodurch die Proliferation der B-Zellen reguliert wird. Dadurch kann auch die erhöhte Frequenz apoptotischer B-Zellen in der WT Gruppe erklärt werden. Mit Hilfe unseres T-B Transfersystems konnten wir weiterhin zeigen, dass die optimale Herunterregulation von IgM und IgD auf B-Zellen bei einer T-Zell-abhängigen Immunantwort nur durch eine Kostimulation über ICOS erfolgen kann und die weitere Differenzierung zu reifen Effektor-B-Zellen ICOS-abhängig ist.

Da der Aktivierungsstatus der transgenen T-Zellen nicht durch ICOS reguliert wird, sollte mit einer erhöhten Gabe von OT-2 ICOS KO T-Zellen die schlechtere T-Zellexpansion ausgeglichen werden. Dadurch wurde gewährleistet, dass an Tag 3 die T-Zellfrequenzen in allen Gruppen vergleichbar sind. Mit diesem Versuchsaufbau versprach man sich, dass die ICOS-abhängigen B-Zelleffekte kompensiert werden können und es konnte gezeigt werden, dass die verringerte B-Zellexpansion bzw. B-Zellproliferation, die verminderte B-Zellaktivierung und Fähigkeit zum Ig-Klassenwechsel annähernd ausgeglichen werden konnten.

Mit Hilfe unseres adoptiven T-B Kooperationsmodell konnten wir erstmalig *in vivo* zeigen, dass eine ICOS-Defizienz sich schon in frühen Phasen einer Immunantwort auf die B-Zellaktivierung und B-Zellproliferation auswirkt. Eine fehlende ICOS-Interaktion führt zu T-Zelleffekten, die einer OX40-Defizienz ähnlich sind (Rogers et al., 2001). In wieweit sich die Zytokinsekretion der T-Zellen auf die B-Zellaktivierung auswirkt, ist bisher in unseren adoptiven T-B Transfermodell noch nicht untersucht worden.

4.2.2 ICOS und die Differenzierung reifer B-Zellen zu Effektor-B-Zellen

Dong et al. beobachteten während einer T-Zell-abhängigen Immunantwort, dass die Mikroumgebungen der Keimzentren bei ICOS KO Mäusen nicht aufrechterhalten werden können, wodurch kleinere oder komplett fehlende Keimzentren zu beobachten sind. Der gleiche Phänotyp wurde bei LT β R KO Mäusen beobachtet (Vu et al., 2008). Eine Vielzahl von Untersuchungen zeigen deutlich, dass eine ICOS-Defizienz verschiedenste Faktoren beeinflusst, die wiederum bei der Bildung der Keimzentrumsreaktion eine Rolle spielen. Das Modell der sequenziellen Aktivierung von ICOS, CD40 und LT β R während einer T-Zell-abhängigen Keimzentrumsreaktion gibt eine Zusammenfassung über den Gesamt Ablauf einer Keimzentrumsreaktion (Vu et al. 2008). Es besagt, dass nach einer Immunisierung die Antigen-spezifischen B-Zellen zum Rand der B-Zellfollikel wandern, wo sie die T-Zellhilfe durch TFH erlangen. Bei der Interaktion von Antigen-spezifischen B- und T-Zellen über ICOS/ICOS-L werden die Oberflächenmarker CD40L und CXCR5 auf den TFH hochreguliert. Dies führt dazu, dass die TFH in die Keimzentren einwandern können. Die CD40L Expression der TFH stimuliert die benachbarten Keimzentrums-B-Zellen zur Hochregulation von LT $\alpha\beta$. Durch eine starke Expression von LT $\alpha\beta$ auf den B-Zellen werden die LT β R auf den FDZ stimuliert, wodurch diese sich zu einem festen Netzwerk zusammenschließen und Chemokine produzieren. Daher ist laut Vu et al. sowohl die Stimulation von CD40/CD40L und des LT β R essentiell, damit eine vollständige Keimzentrumsreaktion stattfindet.

In dieser Arbeit konnte zum einen die reduzierte Keimzentrumsreaktion in ICOS KO Tieren wiederholt beobachtet werden. Außerdem diente das adoptive T-B Transfermodell dazu, die Keimzentrumsreaktion auf der Ebene von Antigen-spezifischen T- und B-Zellen und deren Interaktion zu untersuchen. Damit ein funktionelles Keimzentrum gebildet werden kann, ist es nötig, dass Moleküle von B-Zellen, FDZs und TFH exprimiert werden, wodurch alle drei Zelltypen miteinander interagieren können. Es ist beschrieben, dass in der Keimzentrumsumgebung die Keimzentrums-B-Zellen mit den FDZ-M1+ Zellen in Kontakt treten (Schwickert et al., 2007). In unseren Untersuchungen mit ICOS KO Mäusen konnten wir im Vergleich zu Kontrolltieren größere bzw. eine erhöhte Anzahl von FDZ-Arealen erkennen, obwohl die Fläche und Anzahl der Keimzentren bei einer ICOS-Defizienz stark verringert ist. Vu et al. beschreiben aber, dass das FDZ-Netzwerk nicht durch eine ICOS-Defizienz beeinträchtigt wird (Vu et al., 2008). Da die Hochregulation von $LT\alpha\beta$ bei B-Zellen in ICOS-defizienten Mäusen beeinträchtigt ist und zur Aufrechterhaltung des FDZ-Netzwerkes die Stimulation von $LT\beta R$ nötig ist, fehlen in $LT\beta$ KO Mäusen die FDZ-Strukturen. Die Stimulation des $LT\beta R$ auf Stromazellen und FDZ spielt auch eine Rolle bei der Sezernierung des Chemokins CXCL13. Sein Rezeptor CXCR5 wird von B-Zellen und TFH exprimiert, wodurch diese zum B-Zellfollikel wandern. Eine ICOS-Defizienz führt zu einer verringerten Expression von CXCR5 auf T-Zellen, einer mangelnden Generierung von TFH und Akkumulation der TFH im Keimzentrum (Akiba et al., 2005; Bossaller et al., 2006). Weiterhin konnten wir zeigen, dass eine ICOS-Defizienz zu einer verringerten CXCR5 Expression der B-Zellen führt (Abb. 23L). Dies würde neben der verringerten B-Zellaktivierung und B-Zellproliferation erklären, weshalb die B-Zellfollikel in der ICOS KO Gruppe verkleinert sind. Weiterhin beeinflusst ICOS auch die Sekretion von IL-21 (Yu et al., 2007). Da IL-21 defiziente Mäuse wie ICOS KO Mäuse einen Defekt bei der Generierung von TFH haben (Vogelzang et al. 2008), stehen die Sekretion von IL-21 und die ICOS-Expression bei der TFH-Generierung im Zusammenhang. Somit greift eine ICOS-Defizienz relativ früh in die Abläufe der Keimzentrumsreaktion ein. Zudem wurde beschrieben, dass eine fehlende Interaktion über ICOS zu einer verringerten CD40L Expression auf TFH führt (McAdam et al., 2001; Tafuri et al., 2001), wodurch die T-Zellhilfe für die B-Zellen beeinträchtigt sind. Histologische Daten unseres adoptiven T-B Transfermodells zeigen, dass eine ICOS-Defizienz möglicherweise auf Grund ihrer verringerten IL-21 Sekretion zu einer mangelnden Generierung der TFH, die wegen ihrer verringerten CXCR5-Expression, nicht in die Keimzentren einwandern können (Abb. 29). Weiterhin wurde gezeigt, dass die TFH im Keimzentrum mit den B-Zellen interagieren und über die Stimulation von CD40/CD40L eine Ausschüttung von Zytokinen erfolgt wodurch die T-Zellhilfe für die B-Zellen stattfindet (Allen et al., 2007). In unseren Untersuchungen konnten wir feststellen,

dass eine ICOS-Defizienz keinerlei Einfluss auf die CD40 Expression bei B-Zellen und CD40L bei T-Zellen hat (Daten nicht gezeigt). Zudem werden regulatorische Moleküle wie BAFF-R und TACI auf Keimzentrums-B-Zellen exprimiert, wodurch das Überleben dieser B-Zellen unterstützt wird. Die verringerte BAFF-R und TACI Expression auf B-Zellen der ICOS KO Gruppe ist ein zusätzlicher Faktor für eine gestörte Keimzentrumsentwicklung.

Da die ICOS-Stimulation zu vielfältigen Konsequenzen führt, die zur optimalen B-Zellaktivierung oder Keimzentrumsreaktion benötigt werden, ist es nicht verwunderlich, dass die Plasmazellreaktion ICOS-abhängig abläuft. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Produktion von CD138⁺ B-Zellen und die Serumtiter diverser Ig-Subklassen durch eine ICOS-Expression beeinflusst wird, wodurch bisher publizierte Daten nochmals reproduziert wurden. Zudem konnten wir feststellen, dass eine ICOS-Defizienz zu verringerten Serumspiegel hoch affiner Ig-Subklassen führt. Mit Hilfe des adoptiven T-B Transfermodells konnte die T-Zell-abhängige Plasmazellreaktion auf der Ebene Antigen-spezifischer T- und B-Zellen untersucht. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Produktion von CD138⁺ B-Zellen durch eine ICOS-Interaktion unterstützt wird. Die Serumtiter der gemessenen Ig-Subklassen (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3) sind bei einer ICOS-Defizienz verringert, ebenso die Bildung von hoch affinen Serum Ig-Subklassen. Da eine Interaktion von OX40/OX40L die Differenzierung zu Plasmazellen begünstigt (Calame et al., 2003), liegt vielleicht ein Defekt dieser kostimulatorischen Interaktion bei ICOS KO Mäusen vor. Unsere Untersuchungen zeigten jedoch keinen Einfluss von ICOS auf die OX40 bzw. OX40L Expression, die die verringerte Anzahl an CD138⁺ Plasmazellen erklären könnte. In diversen Publikationen wurde erläutert, dass eine ICOS-Defizienz bei einer T-Zell-abhängigen Immunantwort zu verringerten Serumtiter der Ig-Subklassen IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG3 und IgE führt (McAdam et al., 2001; Tafuri et al., 2001; Wong et al., 2003; Nurieva et al., 2005; Mahajan et al., 2007). Mehrere Arbeitsgruppen erläuterten auch den Effekt von ICOS auf die Zytokinproduktion, die für den Ig-Klassenwechsel benötigt werden (McAdam et al., 2001; Tafuri et al., 2001; Wong et al., 2003). Die B-Zellproliferation und der Ig-Klassenwechsel zu IgE ist von T_H2-Zytokinen abhängig. Ein T_H2-abhängiges Zytokin, nämlich IL-4, ist als ein wichtiger Regulator der B-Zelldifferenzierung beschrieben. Die verminderte IL-4 Produktion der T-Zellen ICOS-defizienter Mäuse könnte somit auch eine Erklärung für die gestörte B-Zelldifferenzierung und den verringerten Ig-Klassenwechsel sein (Dong et al, 2001a; Tafuri et al., 2001). Da sich aber der Phänotyp von IL-4 defizienten Mäusen deutlich von dem der ICOS-KO Mäuse unterscheidet, kann ein Fehlen von IL-4 alleine keine Erklärungsmöglichkeit für den ICOS KO Phänotyp sein könnte. Ein Ig-Klassenwechsel zu IgG1 und IgG2c ist von T_H1-Zytokinen, wie IFN- γ abhängig. Die IFN- γ Produktion wird jedoch durch eine ICOS-Defizienz nicht verändert

(Mahajan et al., 2007). Daher wurde von dieser Arbeitsgruppe vermutet, dass der Funktionsdefekt der T-Helferzellen unabhängig von der Zytokinproduktion ist. Vielmehr scheint es, dass die Fähigkeit zur Reaktivierung und Differenzierung der Antigen-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen fehlt. Der Phänotyp von SAP KO Mäusen unterstützt diese Theorie (Cannons et al., 2006). Diese Mäuse zeigen keine defekte Zytokinproduktion, aber eine verringerte IgG1 und IgG2a humorale Immunantwort und, interessanterweise, eine gestörte ICOS Expression. Vor kurzem wurde auch eine neue, differenzierte T-Effektorzelle beschrieben. Diese T-Zellsubpopulation hat während ihrer Differenzierung den IL-7R α herunterreguliert und produziert das B-Zellfollikel formende Chemokin CXCL13 in großen Mengen nach einer Immunisierung und Stimulation mit B-Zellen. Besonders auffällig ist diese T-Zellsubpopulation durch ihre hoch effiziente B-Zellhilfe, die auch vergleichbar mit der CD40L oder ICOS-abhängigen T-Zellhilfe für B-Zellen ist. Die Interaktion der IL-7R α + T-Helferzelle mit B-Zellen führt zur Produktion aller Ig-Subtypen. Eine mangelnde IL-7R α Expression dieser T-Helferzellen könnte somit einen Einfluss auf die Regulation und den Ablauf der Ig-Antwort haben (Lim et al., 2007). Mit Hilfe unseres adoptiven T-B Transfermodells konnten wir zeigen, dass bei einer ICOS-Defizienz keine TFH in die Keimzentren einwandern. Daher fehlt die T-Zellhilfe für die B-Zellen, wodurch die Keimzentrumsreaktion nicht Aufrecht erhalten werden kann und ein gestörter Ig-Klassenwechsel ist möglicherweise die Folge. Die verringerten Serumspiegel bei ICOS KO Mäusen könnte jedoch auch durch die geringere B-Zellzahlen zustande kommen, wodurch einfach weniger Antikörper sezerniert werden.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass auf Grund der mangelnden T-Zellhilfe bei einer ICOS-Defizienz, eine immense Störung bei der Keimzentrumsreaktion die Folge ist. Die verringerte Fähigkeit zum Ig-Klassenwechsel und verringerter Serumimmunglobulinspiegel sind weitere Folgen der nicht vorhandenen T-Zellhilfe.

4.2.3 ICOS und die B-Zellentwicklung

In mehreren Publikationen wurde der Phänotyp von ICOS-defizienten Mäusen intensiv untersucht und gezeigt, dass eine ICOS-Defizienz keinerlei Einfluss auf die T- bzw. B-Zellzahlen hat. Mit Hilfe verschiedener Analysemethoden konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden, dass eine ICOS-Defizienz sich nicht auf die Zellzahlen der Blutbestandteile auswirkt. Die Anzahl der Erythrozyten und Lymphozyten, sowie die T- und B-Zellzahlen werden durch eine fehlende ICOS-Expression nicht beeinflusst. Genauere Untersuchungen der Zusammensetzung des B-Zellpools zeigten jedoch eine Abhängigkeit zwischen einer ICOS-Defizienz und der Zellzahlen

der einzelnen B-Zellsubpopulationen. Eine grobe Einteilung der B-Zellsubpopulation mit Hilfe der Oberflächenexpression von IgM und IgD führte jedoch auf den ersten Blick zu widersprüchlichen Ergebnissen zwischen zwei Organen. Der Unterschied in der Frequenz der IgM+IgD⁺ B-Zellen zwischen ICOS-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen ist im Blut weniger signifikant als in der Milz. Auch die Anzahl der IgM+IgD⁻ B Zellen ist nicht konsistent zwischen Blut- und Milzanalysen. Nur die Untersuchungen der IgM-IgD⁻ B-Zellsubpopulation in den beiden Organen führt zu identischen Ergebnissen. Die scheinbar widersprüchlichen Ergebnissen liegen vermutlich an der unterschiedlichen Zusammensetzung des B-Zellpools im Blut und in der Milz. Es ist bekannt, dass B-Zellen der einzelnen Entwicklungsstufen sich in ihrem Migrationsverhalten unterscheiden. Bei IgM+IgD⁻ B-Zellen kann es sich nicht nur um aktivierte B-Zellen, sondern auch um T1 B-Zellen handeln. Diese B-Zellen wandern nach der ersten negativen Selektion mit endogenen Antigenen vom Knochenmark über den Zentralsinus zur weiteren Reifung in die Milz. Da aber in der Milz bei ICOS KO Tieren weniger T2 B-Zellen messbar sind, ist es möglich, dass T1 B-Zellen vermehrt in die Milz einwandern um den Defekt im T2 Stadium zu kompensieren. Die erhöhte IgM+IgD⁻ B-Zellpopulation im Blut bei ICOS KO Mäusen bestätigt diese Vermutung.

Reife B-Zellen der Milz werden oft mit Hilfe der Oberflächenmarker CD21 und CD23 in ihrer Subpopulationen eingeteilt. Die Identifikation der B-Zellentwicklungsstufen mit Hilfe der Oberflächenexpression von IgM und IgD oder CD21 und CD23 führte aber auch innerhalb eines Organs zu widersprüchlichen Ergebnissen bei den B-Zellfrequenzen. Eine positive Koexpression von IgM und IgD definiert folgende B-Zellen in der Milz: T2 B-Zellen und reife, folliculäre B-Zellen. Diese B-Zellsubpopulationen besitzen neben T3 B-Zellen auch das gleiche CD21/CD23 Expressionsmuster. Daher scheint es, dass bei einer B-Zelleinteilung mit Hilfe von IgM und IgD weniger folliculäre B-Zellen in ICOS KO Tieren detektiert werden können, bei einer Einteilung über CD21 und CD23 ICOS keinen Effekt auf die Generierung der folliculären B-Zellen hat. Diese Ergebnisse machen nochmals deutlich, wie wichtig es zur eindeutigen Identifikation der einzelnen B-Zellsubpopulationen ist, in der Durchflusszytometrie mehrere Oberflächenantigene zu verwenden. Im Knochenmark unterscheiden sich Vorläufer-B-Zellen von zirkulierenden B-Zellen über eine positive Expression der Oberflächenmarker CD43 und CD93. Sowohl Hardy et al. als auch Tung et al. haben verschiedene Strategien in der Durchflusszytometrie veröffentlicht, um die einzelnen Entwicklungsstufen der B-Zellen im Knochenmark zu identifizieren. Jedoch verzichten beide Arbeitsgruppen auf die Verwendung von CD93, dessen Expression sich zwischen Vorläufer-B-Zellen und zirkulierende B-Zellen im Knochenmark unterscheidet. Daher hat die hier entwickelte Strategie zur Analyse der B-Zellsubpopulation im Knochenmark durch die Verwendung

des CD93 Antigens den eindeutigen Vorteil, dass die einzelnen B-Zellsubpopulationen nicht durch zirkulierende B-Zellen verunreinigt sind.

Diese Arbeit gibt auch eine überarbeitete Schritt-für-Schritt Anleitung zur Identifikation der einzelnen B-Zellentwicklungsstufen in der Mausmilz. Besonderes Merkmal dieser Strategie ist wiederum die Analyse der CD93 Expression auf B-Zellen. Dies ist insoweit nötig, um transitionelle B-Zellen von reifen B-Zellen zu unterscheiden. Die Strategien zur Identifikation der einzelnen Entwicklungsstufen im Knochenmark und in der Milz sind in den ersten Schritten vergleichbar. Generell hat sich bei der Auswertung der Durchflusszytometrieanalysen besonders bewährt, die Oberflächenmarker B220 und IgD gegenüber zu stellen, da in dieser Darstellung alle B-Zellen sichtbar sind und somit das Abschneiden von B-Zellen mit der Markierung verhindert werden kann. Wo genau die Grenze zwischen CD93 positiv und negativ tragenden B-Zellen liegt, wurde wie folgt festgestellt: die CD93 Expression der T-Zellen dient als Negativkontrolle, da T-Zellen CD93 nicht exprimieren. Die Fluoreszenzhelligkeit der CD93 T-Zellexpression dient als genaue Markierung für der Grenze zwischen Vorläufer-B-Zellen und reifen B-Zellen. Da die B-Zellentwicklung über die Hoch- und Runterregulation diverser Aktivierungsmarker untersucht wird und die einzelnen Subpopulationen so eng beieinander liegen, ist es schwierig, die Grenze für die einzelnen Marker eindeutig zu definieren. Daher scheint es, dass Markierungen durch Zellpopulation hindurch gezogen wurden oder aber dass Markierungen zweier Subpopulationen sich überschneiden. Aber auch in diesen Fällen wurde, wie im Fall der CD93 Markierung die Eingrenzung der Zellpopulationen über die Fluoreszenzintensität der verwendeten Antikörper sorgfältig kontrolliert. Weiterhin wurde für die statistischen Analysen der Vorläufer-B-Zellen im Knochenmark die Zellfrequenzen der Fraktionen A bis D der vier Untergruppen aufaddiert. Nur mit Hilfe dieser aufwendigen Strategien konnte in der Durchflusszytometrie aufgeklärt werden, in wieweit sich ICOS auf die B-Zellentwicklung auswirkt.

Da eine ICOS-Defizienz sich nicht auf die CD93 Expression der B-Zellen im Knochenmark auswirkt, konnte vermutet werden, dass eine Regulation der B-Zellentwicklung durch eine ICOS/ICOS-L Interaktion nicht in den frühen Entwicklungsstufen stattfindet. Die Analyse der B-Zellfrequenzen der Vorläufer-B-Zellen im Knochenmark zeigten zwischen WT und ICOS KO Tieren keinen Unterschied. Nach Bestimmung der ICOS-L Expression auf den frühen Vorläufer-B-Zellen wurde deutlich, dass ICOS-L nicht auf Vorläufer-B-Zellen exprimiert wird und daher auch keinen Einfluss auf die Regulation der B-Zellentwicklung haben kann. Es ist beschrieben, dass in ICOS KO Mäusen die ICOS-L Expression im Vergleich zu WT Tieren erhöht ist. Daher eigneten sich diese Tiere besonders gut für diese Analyse, da eine leichte Hochregulation von ICOS-L stärker sichtbar wird als bei WT Tieren. Die signifikant verringerte CD93+

B-Zellfrequenz bei ICOS KO Mäusen in der Milz deutet darauf hin, dass eine ICOS-Defizienz die B-Zellentwicklung möglicherweise erst dort beeinflusst. Tatsächlich wird ICOS-L erst ab dem T2 Stadium auf B-Zellen exprimiert. Die Analyse der B-Zellentwicklungsstufen in der Milz zeigten eine deutlich verringerte B-Zellfrequenz bei ICOS KO Tieren im T2 Stadium. Der signifikante Unterschied in diesem B-Zellentwicklungsstadium entsteht durch die verringerte B-Zellfrequenz der T2 MZ pre B-Zellen. Die Zellfrequenzen der T1, T2 CD21^{int} und T3 B-Zellen sowie die reifen, follikulären und Marginalzonen-B-Zellen unterscheiden sich nicht zwischen WT und ICOS KO Mäusen. Daher kann vermutet werden, dass eine ICOS-Defizienz zu einer verringerten B-Zellreifung zwischen dem Übergang von T2 CD21^{int} B-Zellen und T2 MZ pre B-Zellen führt. Im nächsten Abschnitt sollen mögliche Mechanismen für die verminderte T2 B-Zellfrequenz erläutert werden.

4.2.4 Mögliche Faktoren und Mechanismen für eine gestörte B-Zellentwicklung

Untersuchungen diverser Transkriptionsfaktoren bei der B-Zellentwicklung mit Hilfe von KO Mäusen zeigten eine transkriptionelle Kontrolle bei der Hämatopoese. Auch Defekte bei der Ig-Rearrangierung oder BZR-Bildung können Einfluss auf die B-Zellentwicklung haben. In diesem Abschnitt sind einige Defekte zusammengefasst, die die B-Zellentwicklung in verschiedenen Entwicklungsstadien zum Unterliegen bringt.

Zum Beispiel führt die Inaktivierung des E2A Gens, das eine kritische Rolle bei der Initialisierung des Ig-Rearrangements spielt (Jacobs et al., 1994; Zhuang et al., 1996), zu einem Stopp der B-Zellentwicklung in einem sehr frühen Stadium, bei dem B220 erst hochreguliert wird (Bain et al., 1997). EBF-defiziente Mäuse zeigten zwar eine erhöhte Frequenz dieser Fraktion A Vorläufer-B-Zellen, doch ist der weitere Entwicklungsprozess unterbrochen (Lin et al., 1995). Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor für die B-Zellentwicklung ist Pax-5. Das Fehlen von Pax-5 führt zu einer Blockierung der B-Zellentwicklung im frühen pro-B-Zellstadium (Nutt et al., 1997). Bei SCID und Rag KO Mäuse kommt die B-Zellentwicklung nach dem Fraktion C Stadium zu erliegen. Beide Mausstämme besitzen Defekte bei der Ig-Rearrangierung, wodurch der Entwicklungsstopp erklärbar ist (Oettinger et al., 1990; Reichman-Fried et al., 1990; Mombaerts et al. 1992; Shinkai et al. 1992; Blunt et al., 1995). Fehlt auf Grund einer defekten Rearrangierung oder einer direkten Genausschaltung (J_H Knockout) die schwere Kette, resultiert dies in einer Entwicklungsblockade im selben Stadium (Kitamura et al. 1992; Gong et al. 1996). Unsere Analysen zeigten jedoch, dass eine ICOS-Defizienz die B-Zellentwicklung erst in der Milz beeinträchtigt. Aber auch in diesem Stadium der B-Zellentwicklung gibt es eine Vielzahl von

aufgeklärten Faktoren, die eine eingeschränkte B-Zellentwicklung erklären. Das Fehlen des zytoplasmatischen Teils von Ig α (Teil des BZR) (Torres et al., 1996) oder des Proteins Tyrosin Kinase Syk führt bei Mäusen zu einem signifikanten B-Zellentwicklungsblock im Stadium T1 (Turner et al., 1995; Saijo et al., 2003). In Milzen von CD45-defizienten oder Brutons Tyrosin Kinase (BtK) mutierten Mäusen ist die B-Zellentwicklung vom T2 in das reife B-Zellstadium unterbrochen (Nitschke et al., 1997). Ein weiterer wichtiger Faktor für die B-Zellreifung in der Milz und das Überleben der B-Zellen ist der B-Zellaktivierungsfaktor BAFF (Mackay et al., 2002), der an seinen Liganden BAFF-R bindet. Schiemann et al. zeigten, dass eine murine BAFF- bzw. BAFF-R Defizienz zu einem B-Zellentwicklungsstopp im T1 Stadium und ein Fehlen von T2 B-Zellen und reifen B-Zellen führt. Bei einer BAFF Überexpression ist eine B-Zellakkumulation im T2 Stadium zu beobachten (Batten et al., 2000; Mackay et al., 1999). Daher liegt die Vermutung nahe, dass BAFF die B-Zellentwicklung von T1 zu T2 und zu reifen B-Zellen durch Regulation der T2 B-Zellanzahl kontrolliert. Da die B-Zellentwicklung in ICOS KO Tieren erst nach dem T1 Stadium gestört ist, wurde vermutet, dass die BAFF-R Expression durch die ICOS-Defizienz beeinflusst wurde. Daher wurden die BAFF-R Expressionen der einzelnen B-Zellentwicklungsstufen in Milzen von WT und ICOS KO Mäusen untersucht. Deutlich erkennbar ist, dass BAFF-R erst ab dem T2 Stadium exprimiert wird, das durch die ICOS-Defizienz betroffen ist. Jedoch ist die erhöhte Expression von BAFF-R auf ICOS KO B Zellen der Stadien T2 und T3 überraschend und erklärt daher nicht die geringere T2 B-Zellfrequenz bei ICOS KO Tieren. Vielmehr würde man bei einer leichten BAFF-R Hochregulation auch eine erhöhte B-Zellfrequenz der T2 B-Zellen erwarten. Weiterhin ist ein Zusammenhang zwischen der ICOS-Expression und Regulation von BAFF-R gezeigt worden. Ein B-Zellabsterben nach dem T1 Stadium bei ICOS KO Mäusen kann ausgeschlossen werden. Zum einen führt eine ICOS-Defizienz nicht zu einer verstärkten Apoptose der T2 B-Zellen, zum anderen spricht die erhöhte BAFF-R Expression dagegen, da doch bei Interaktion mit BAFF das Überleben der B-Zellen gesichert wird. Die verringerte B-Zellfrequenz der T2 ICOS KO B-Zellen kann auch nicht durch eine verstärkte Proliferation der WT T2 B-Zellen erklärt werden. Vielmehr scheint es, dass B-Zellen im T2 Stadium stärker bei einer ICOS-Defizienz proliferieren. Möglicherweise kann eine verlangsamte Differenzierung beim Übergang vom T2 CD21^{int} Stadium zum T2 MZ pre Stadium der ICOS KO B-Zellen dieses Phänomen erklären. Die ICOS-Defizienz scheint keinen Einfluss auf die B-Zellfrequenzen des T3 Stadiums, der follikulären B-Zellen und der Marginalzonen-B-Zellen zu haben. Jedoch zeigten Transfer Experimente, dass Marginalzonen-B-Zellen wieder aus reifen B-Zellen entstehen können (Carsetti et al., 2004). Zusätzlich wurde festgestellt, dass bei Mäusen nach einer Splenektomie sich aus T1 B-Zellen direkt reife B-Zellen entwickeln können (Carsetti et

al., 2004). Daher ist unklar, ob die ICOS-Defizienz die Reifung von T2 MZ pre B-Zellen zu Marginalzonen-B-Zellen beeinträchtigt. Um diese Theorie jedoch beweisen zu können, müssen neue Strategien zur Aufklärung dieses Phänomens entwickelt werden.

4.3 ICOS-Defizienz Patienten im Vergleich zu ICOS KO Mäusen

Grimbacher et al. haben 2003 die ICOS-Defizienz bei Menschen beschrieben, eine neue, autosomal rezessive Erkrankung, die sich im Krankheitsbild der adulten CVID äußert. Diese Patienten können auf Grund der mangelnden T-Zellhilfe für die B-Zellen keine normale Anzahl an Gedächtnis B-Zellen und Serum Ig-Konzentrationen generieren oder erhalten (Grimbacher et al., 2003). Die Untersuchungen der B-Zelldifferenzierung der ICOS-Defizienz Patienten konnten zum größten Teil nur mit Hilfe von Blutspenden der entsprechenden Patienten durchgeführt werden. Dabei konnte deutlich gezeigt werden, dass die B-Zellanzahl deutlich verringert ist, die Differenzierung zu reifen B-Zellen und die CD27 Expression fast vollständig fehlt. Außerdem verursacht eine humane ICOS-Defizienz eine verringerte IgM Serumimmunglobulinspiegel und weniger klassengewechselte Ig-Isotypen. Im Gegensatz dazu ist die Anzahl der B-Zellen und der B-Zellreifungsstatus in jungen ICOS KO Mäusen im Blut normal (McAdams et al., 2001; Tafuri et al., 2001). Man könnte vermuten, dass diese Diskrepanz daran liegt, da junge Mäuse analysiert wurden, wohingegen ICOS-Defizienz Patienten erst im Erwachsenenalter untersucht wurden, bei dem sich der immundefiziente Phänotyp erst manifestiert. Unsere Untersuchungen mit sechs Monate alten ICOS KO Mäusen zeigten, dass sich der ICOS-Phänotyp mit dem Alter nicht verändert und der B-Zellpool sich nicht von jungen Mäusen unterscheidet. Weiterhin könnte die Diskrepanz im B-Zellpool auch daran liegen, dass ICOS KO Mäuse in einer SPF-Zucht und Umgebung gehalten werden, wohingegen ICOS-Defizienz Patienten im Laufe ihres Lebens immer wieder mit Pathogenen in Berührung kommen. Auch diese Hypothese wurde in dieser Arbeit untersucht, indem man die Tiere mehrfach in regelmäßigen Zeitabständen mit einem Cocktail von hitzeinaktivierten Bakterien immunisiert hat. Dieses Vorgehen führte aber ebenfalls zu keiner Veränderung des B-Zellpools, obwohl sich die Immunisierung der ICOS KO Mäuse über mindestens acht Monate hinweg zog (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse über eine verringerte B-Zellzahl der ICOS-Defizienz Patienten stammen aber nur aus Blutuntersuchungen. Jedoch unterscheiden sich die Verteilung der Lymphozyten im Blut zwischen Mäusen und Menschen sehr stark. Der B-Zellpool im Mausblut macht 50% der gesamten Lymphozytenpopulation aus während nur 6-19% B-Zellen im Blut bei Menschen detektiert werden können. In unseren Ergebnissen könnte deutlich gezeigt werden, dass sich bei Mäusen die B-Zellzusammensetzung zwischen Blut und Milz unterscheidet. Da es aber bisher nicht möglich war, die B-Zellzusammensetzung der Milz

mit dem Blut der ICOS-Defizienz Patienten zu vergleichen, kann über Unterschiede beim B-Zellpool zwischen den beiden Organen nur spekuliert werden. Unsere Untersuchungen zeigten im Blut und Milz bei ICOS KO Mäusen eine verringerte IgM+IgD⁺ und IgM-IgD⁻ B-Zellfrequenz, die auf eine gestörte Generierung von naiven B-Zellen und möglicherweise auch auf einen verringerten Ig-Klassenwechsel hindeutet. Daher bestätigen diese Analysen von WT und ICOS KO Mäusen die Studien der ICOS-Defizienz Patienten und zeigen einen Einfluss von ICOS auf den B-Zellpool. Bei zwei ICOS-Defizienz Patienten konnten Knochenmarksbiopsien durchgeführt werden und damit Einblicke in die frühe B-Zellentwicklung bei diesen Patienten gewonnen werden. Die pro-B-Zellpopulationen sind leicht und die pre-B-Zellsubpopulationen sind stark erhöht im Vergleich zu gesunden Patienten. Daher könnte eine partielle Blockierung im T2 Stadium die Ursache sein, warum sich diese B-Zellen nicht zu reifen B-Zellen entwickeln und eine Anhäufung dieser B-Zellstadien die Folge ist (Warnatz et al., 2006). Unsere Untersuchungen der B-Zellentwicklungsstufen im Knochenmark zeigten jedoch, dass die B-Zellfrequenzen der frühen Fraktionen A bis C' nicht durch eine ICOS-Defizienz beeinflusst werden. Die B-Zellfrequenzen der späten B-Zellentwicklungsstufen in der Milz sind im Vergleich zu WT Tieren verringert und eine Anhäufung der T1 und T2 B-Zellstadien ist nicht zu beobachten. Jedoch kann eine Untersuchung von zwei Individuen nicht die Grundlage für die Theorie der gestörten B-Zellreifung sein. Daher ist eine detaillierte Analyse der B-Zellentwicklung im Knochenmark und der Milz bei ICOS-Defizienz Patienten nötig damit Vergleiche mit ICOS KO Mäusen zulässig sind.

Die reduzierte Anzahl von zirkulierenden Gedächtnis B-Zellen (Brouet et al., 2000; Jacquot et al., 2001; Warnatz et al. 2002) und das Fehlen von Plasmazellen in der Lamina propria und im Knochenmark (Herbst et al., 1994; Artus et al., 1995) deuten auf ein nicht ausreichendes Gedächtnis-B-Zellkompartiment hin. Grimbacher et al. postulieren, dass ICOS primär die Generation und/oder Expansion von Gedächtnis B-Zellen und langlebigen Plasmazellen unterstützt und erhält. Ein Ig-Klassenwechsel ist nicht grundsätzlich abhängig von einer ICOS/ICOS-L Interaktion aber könnte durch ICOS vermittelte Signale verstärkt werden. Hinweise dafür liefern nicht nur Studien an ICOS-Defizienz Patienten sondern auch Untersuchungen an ICOS KO Mäusen. Auch in unseren Studien an ICOS KO Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine ICOS-Defizienz die Plasmazellanzahl verringert. Zudem konnten wir nachweisen, dass ICOS nicht nur die Serumimmunglobulinspiegel der einzelnen Isotypen beeinflusst, sondern auch bei der Affinitätsreifung der Serumimmunglobuline eine Rolle spielt. Warnatz et al. vermuteten auf Grund der verringerten Gedächtnis-B-Zellen und mangelnden IgM Sekretion, dass eine ICOS-Defizienz beim Menschen zu einer gestörten Keimzentrumsreaktion führt, die auch bei ICOS KO Mäusen zu beobachten ist. Die Lymphknotenbiopsie einer ICOS-Defizienz Patientin zeigten eine Zytopenie

und eine gestörte follikuläre Struktur. Die Größe und Anzahl der B-Zellfollikel erschienen geringer im Vergleich zu Kontrollpatienten. Die wenigen B-Zellfollikel waren umgeben von CD4-CD8+ T-Zellen und enthielten Bcl-6+ proliferierende B-Zellen. Auch hier müssen detaillierte Analysen zur Keimzentrumsreaktion bei ICOS-Defizienz Patienten unternommen werden, damit Vergleiche mit ICOS KO Mäusen zulässig sind. Histologische Untersuchungen von drainierenden Lymphknoten in unserem adoptiven T-B Transfermodell zeigten vergleichbare Ergebnisse mit den von ICOS-Defizienz Patienten. Eine fehlende ICOS-Interaktion führt zur Bildung kleinerer B-Zellfollikel und eine verringerte Einwanderung von T-Zellen in die B-Zellzone. Bei diesen T-Zellen handelt es sich um TFH, die die Keimzentrumsreaktion unterstützt. Da in der ICOS KO Gruppe keine TFH in den B-Zellfollikel zu finden sind und die ausgebildeten Keimzentren deutlich kleiner sind als bei der WT Gruppe, kann auch die Vermutung der verringerten Keimzentrumsreaktion bei ICOS-Defizienz Patienten möglich sein.

5 Literaturverzeichnis

- Aigner, S., Stoege, Z. M., Fogel, M., Weber, E., Zarn, J., Ruppert, M., Zeller, Y., Vestweber, D., Stahel, R., Sammar, M. and Altevogt, P., CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood* 1997. 89: 3385-3395.
- Akiba, H., Takeda, K., Kojima, Y., Usui, Y., Harada, N., Yamazaki, T., Ma, J., Tezuka, K., Yagita, H. and Okumura, K., The role of ICOS in the CXCR5⁺ follicular B helper T cell maintenance in vivo. *J Immunol* 2005. 175: 2340-2348.
- Allen, C. D., Okada, T., Tang, H. L. and Cyster, J. G., Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* 2007. 315: 528-531.
- Allen, C. D. and Cyster, J. G., Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Semin Immunol* 2008. 20: 14-25.
- Amano, M., Baumgarth, N., Dick, M. D., Brossay, L., Kronenberg, M., Herzenberg, L. A. and Strober, S., CD1 expression defines subsets of follicular and marginal zone B cells in the spleen: beta 2-microglobulin-dependent and independent forms. *J Immunol* 1998. 161: 1710-1717.
- Artus, U., Herbst, E. W., Rump, J. A. and Peter, H. H., [Defects in the immunoglobulin producing cells in bone marrow of patients with variable immunodeficiency syndrome]. *Immun Infekt* 1995. 23: 69-71.
- Bain, G., Engel, I., Robanus Maandag, E. C., te Riele, H. P., Volland, J. R., Sharp, L. L., Chun, J., Huey, B., Pinkel, D. and Murre, C., E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* 1997. 17: 4782-4791.
- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J. P., van Kooten, C., Liu, Y. J., Rousset, F. and Saeland, S., The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 1994. 12: 881-922.
- Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R. and Carbone, F. R., Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 1998. 76: 34-40.
- Batten, M., Groom, J., Cachero, T. G., Qian, F., Schneider, P., Tschopp, J., Browning, J. L. and Mackay, F., BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med* 2000. 192: 1453-1466.
- Beier, K. C., Hutloff, A., Dittrich, A. M., Heuck, C., Rauch, A., Buchner, K., Ludewig, B., Ochs, H. D., Mages, H. W. and Krocze, R. A., Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur J Immunol* 2000. 30: 3707-3717.
- Benson, M. J., Erickson, L. D., Gleeson, M. W. and Noelle, R. J., Affinity of antigen encounter and other early B-cell signals determine B-cell fate. *Curr Opin Immunol* 2007. 19: 275-280.
- Berek, C., Do B cells play an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Z Rheumatol* 2005. 64: 383-388.
- Allman, D., Lindsley, R. C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S. A. and Hardy, R. R., Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol* 2001. 167: 6834-6840.
- Berendt, A. R., McDowall, A., Craig, A. G., Bates, P. A., Sternberg, M. J., Marsh, K., Newbold, C. I. and Hogg, N., The binding site on ICAM-1 for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site. *Cell* 1992. 68: 71-81.
- Bhattacharya, A., Dorf, M. E. and Springer, T. A., A shared alloantigenic determinant on Ia antigens encoded by the I-A and I-E subregions: evidence for I region gene duplication. *J Immunol* 1981. 127: 2488-2495.
- Blunt, T., Finnie, N. J., Taccioli, G. E., Smith, G. C., Demengeot, J., Gottlieb, T. M., Mizuta, R., Varghese, A. J., Alt, F. W., Jeggo, P. A. and et al., Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* 1995. 80: 813-823.
- Bonhagen, K., Liesenfeld, O., Staderker, M. J., Hutloff, A., Erb, K., Coyle, A. J., Lipp, M., Krocze, R. A. and Kamradt, T., ICOS⁺ Th cells produce distinct cytokines in different mucosal immune responses. *Eur J Immunol* 2003. 33: 392-401.
- Bossaller, L., Burger, J., Draeger, R., Grimbacher, B., Knoth, R., Plebani, A., Durandy, A., Baumann, U., Schlesier, M., Welcher, A. A., Peter, H. H. and Warnatz, K., ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5⁺CD4⁺ germinal center Th cells. *J Immunol* 2006. 177: 4927-4932.
- Brodie, D., Collins, A. V., Iaboni, A., Fennelly, J. A., Sparks, L. M., Xu, X. N., van der Merwe, P. A. and Davis, S. J., LICOS, a primordial costimulatory ligand? *Curr Biol* 2000. 10: 333-336.
- Brouet, J. C., Chedeville, A., Femand, J. P. and Royer, B., Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol* 2000. 30: 2516-2520.
- Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G. and Golstein, P., A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 1987. 328: 267-270.

5. Literaturverzeichnis

- Burmeister, Y., Lischke, T., Dahler, A. C., Mages, H. W., Lam, K. P., Coyle, A. J., Kroczeck, R. A. and Hutloff, A., ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol* 2008. 180: 774-782.
- Calame, K. L., Lin, K. I. and Tunyaplin, C., Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol* 2003. 21: 205-230.
- Camacho, S. A., Kosco-Vilbois, M. H. and Berek, C., The dynamic structure of the germinal center. *Immunol Today* 1998. 19: 511-514.
- Campbell, D. G., Gagnon, J., Reid, K. B. and Williams, A. F., Rat brain Thy-1 glycoprotein. The amino acid sequence, disulphide bonds and an unusual hydrophobic region. *Biochem J* 1981. 195: 15-30.
- Cannons, J. L., Yu, L. J., Jankovic, D., Crotty, S., Horai, R., Kirby, M., Anderson, S., Cheever, A. W., Sher, A. and Schwartzberg, P. L., SAP regulates T cell-mediated help for humoral immunity by a mechanism distinct from cytokine regulation. *J Exp Med* 2006. 203: 1551-1565.
- Carsetti, R., Kohler, G. and Lamers, M. C., Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med* 1995. 181: 2129-2140.
- Carsetti, R., Rosado, M. M. and Wardmann, H., Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 2004. 197: 179-191.
- Cascalho, M., Ma, A., Lee, S., Masat, L. and Wabl, M., A quasi-monoclonal mouse. *Science* 1996. 272: 1649-1652.
- Caux, C., Burdin, N., Galibert, L., Hermann, P., Renard, N., Servet-Delprat, C. and Banchereau, J., Functional CD40 on B lymphocytes and dendritic cells. *Res Immunol* 1994. 145: 235-239; discussion 244-239.
- Chambers, C. A. and Allison, J. P., Co-stimulation in T cell responses. *Curr Opin Immunol* 1997. 9: 396-404.
- Coffman, R. L. and Weissman, I. L., Immunoglobulin gene rearrangement during pre-B cell differentiation. *J Mol Cell Immunol* 1983. 1: 31-41.
- Coyle, A. J., Lehar, S., Lloyd, C., Tian, J., Delaney, T., Manning, S., Nguyen, T., Burwell, T., Schneider, H., Gonzalo, J. A., Gosselin, M., Owen, L. R., Rudd, C. E. and Gutierrez-Ramos, J. C., The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 2000. 13: 95-105.
- Croft, M., Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 2003. 3: 609-620.
- Cyster, J. G., Homing of antibody secreting cells. *Immunol Rev* 2003. 194: 48-60.
- de Boer, M., Kasran, A., Kwekkeboom, J., Walter, H., Vandenbergh, P. and Ceuppens, J. L., Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells. *Eur J Immunol* 1993. 23: 3120-3125.
- de Vinuesa, C. G., Cook, M. C., Ball, J., Drew, M., Sunners, Y., Cascalho, M., Wabl, M., Klaus, G. G. and MacLennan, I. C., Germinal centers without T cells. *J Exp Med* 2000. 191: 485-494.
- Dialynas, D. P., Wilde, D. B., Marrack, P., Pierres, A., Wall, K. A., Havran, W., Otten, G., Loken, M. R., Pierres, M., Kappler, J. and et al., Characterization of the murine antigenic determinant, designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK1.5: expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity. *Immunol Rev* 1983. 74: 29-56.
- Dong, C., Juedes, A. E., Temann, U. A., Shresta, S., Allison, J. P., Ruddle, N. H. and Flavell, R. A., ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 2001a. 409: 97-101.
- Dong, C., Temann, U. A. and Flavell, R. A., Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions. *J Immunol* 2001b. 166: 3659-3662.
- Freeman, G. J., Borriello, F., Hodes, R. J., Reiser, H., Gribben, J. G., Ng, J. W., Kim, J., Goldberg, J. M., Hathcock, K., Laszlo, G. and et al., Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J Exp Med* 1993. 178: 2185-2192.
- Gallatin, W. M., Weissman, I. L. and Butcher, E. C., A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 1983. 304: 30-34.
- Garside, P., Ingulli, E., Merica, R. R., Johnson, J. G., Noelle, R. J. and Jenkins, M. K., Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 1998. 281: 96-99.
- Gause, W. C., Halvorson, M. J., Lu, P., Greenwald, R., Linsley, P., Urban, J. F. and Finkelman, F. D., The function of costimulatory molecules and the development of IL-4-producing T cells. *Immunol Today* 1997. 18: 115-120.
- Gong, S. and Nussenzweig, M. C., Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig beta. *Science* 1996. 272: 411-414.
- Greenwald, R. J., McAdam, A. J., Van der Woude, D., Satoskar, A. R. and Sharpe, A. H., Cutting edge: inducible costimulator protein regulates both Th1 and Th2 responses to cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 2002. 168: 991-995.
- Grewal, I. S. and Flavell, R. A., CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998. 16: 111-135.

- Grimbacher, B., Hutloff, A., Schlesier, M., Glocker, E., Warnatz, K., Drager, R., Eibel, H., Fischer, B., Schaffer, A. A., Mages, H. W., Kroczeck, R. A. and Peter, H. H., Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 2003. 4: 261-268.
- Gross, J. A., Callas, E. and Allison, J. P., Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J Immunol* 1992. 149: 380-388.
- Gross, J. A., Dillon, S. R., Mudri, S., Johnston, J., Littau, A., Roque, R., Rixon, M., Schou, O., Foley, K. P., Haugen, H., McMillen, S., Waggie, K., Schreckhise, R. W., Shoemaker, K., Vu, T., Moore, M., Grossman, A. and Clegg, C. H., TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. *Immunity* 2001. 15: 289-302.
- Groth, C., Drager, R., Warnatz, K., Wolff-Vorbeck, G., Schmidt, S., Eibel, H., Schlesier, M. and Peter, H. H., Impaired up-regulation of CD70 and CD86 in naive (CD27-) B cells from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* 2002. 129: 133-139.
- Haberman, A. M. and Shlomchik, M. J., Reassessing the function of immune-complex retention by follicular dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2003. 3: 757-764.
- Hardie, D. L., Johnson, G. D., Khan, M. and MacLennan, I. C., Quantitative analysis of molecules which distinguish functional compartments within germinal centers. *Eur J Immunol* 1993. 23: 997-1004.
- Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Kemp, J. D. and Hayakawa, K., Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 1991. 173: 1213-1225.
- Hardy, R. R. and Hayakawa, K., B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 2001. 19: 595-621.
- Hauser, A. E., Junt, T., Mempel, T. R., Sneddon, M. W., Kleinstein, S. H., Henrickson, S. E., von Andrian, U. H., Shlomchik, M. J. and Haberman, A. M., Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns. *Immunity* 2007. 26: 655-667.
- Herbst, E. W., Armbruster, M., Rump, J. A., Buscher, H. P. and Peter, H. H., Intestinal B cell defects in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 1994. 95: 215-221.
- Hestdal, K., Ruscetti, F. W., Ihle, J. N., Jacobsen, S. E., Dubois, C. M., Kopp, W. C., Longo, D. L. and Keller, J. R., Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol* 1991. 147: 22-28.
- Hiepe, F. and Dorner, T., Autoantibodies and antibody-secreting cells. *Z Rheumatol* 2005. 64: 389-395.
- Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I. and Kroczeck, R. A., ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999. 397: 263-266.
- Hutloff, A., Buchner, K., Reiter, K., Baelde, H. J., Odendahl, M., Jacobi, A., Dorner, T. and Kroczeck, R. A., Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004. 50: 3211-3220.
- Jacob, J., Kassir, R. and Kelsoe, G., In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med* 1991. 173: 1165-1175.
- Jacobs, Y., Xin, X. Q., Dorshkind, K. and Nelson, C., Pan/E2A expression precedes immunoglobulin heavy-chain expression during B lymphopoiesis in nontransformed cells, and Pan/E2A proteins are not detected in myeloid cells. *Mol Cell Biol* 1994. 14: 4087-4096.
- Jacquot, S., Macon-Lemaitre, L., Paris, E., Kobata, T., Tanaka, Y., Morimoto, C., Schlossman, S. F. and Tron, F., B cell co-receptors regulating T cell-dependent antibody production in common variable immunodeficiency: CD27 pathway defects identify subsets of severely immuno-compromised patients. *Int Immunol* 2001. 13: 871-876.
- Jung, L. K., Hara, T. and Fu, S. M., Detection and functional studies of p60-65 (Tac antigen) on activated human B cells. *J Exp Med* 1984. 160: 1597-1602.
- Kelsoe, G., The germinal center: a crucible for lymphocyte selection. *Semin Immunol* 1996. 8: 179-184.
- Kitamura, D. and Rajewsky, K., Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature* 1992. 356: 154-156.
- Kopf, M., Coyle, A. J., Schmitz, N., Barner, M., Oxenius, A., Gallimore, A., Gutierrez-Ramos, J. C. and Bachmann, M. F., Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *J Exp Med* 2000. 192: 53-61.
- Krammer, P. H., Behrmann, I., Daniel, P., Dhein, J. and Debatin, K. M., Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 1994. 6: 279-289.
- Krop, I., de Fougères, A. R., Hardy, R. R., Allison, M., Schlissel, M. S. and Fearon, D. T., Self-renewal of B-1 lymphocytes is dependent on CD19. *Eur J Immunol* 1996. 26: 238-242.
- Krummel, M. F. and Allison, J. P., CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* 1996. 183: 2533-2540.

5. Literaturverzeichnis

- Kung, J. T., Sharrow, S. O., Sieckmann, D. G., Lieberman, R. and Paul, W. E., A mouse IgM allotypic determinant (Igh-6.5) recognized by a monoclonal rat antibody. *J Immunol* 1981. 127: 873-876.
- Laszlo, G., Hathcock, K. S., Dickler, H. B. and Hodes, R. J., Characterization of a novel cell-surface molecule expressed on subpopulations of activated T and B cells. *J Immunol* 1993. 150: 5252-5262.
- Le, T. V., Kim, T. H. and Chaplin, D. D., Intracloal competition inhibits the formation of high-affinity antibody-secreting cells. *J Immunol* 2008. 181: 6027-6037.
- Ledbetter, J. A., Rouse, R. V., Micklem, H. S. and Herzenberg, L. A., T cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens. Two-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with monoclonal antibodies modifies current views. *J Exp Med* 1980. 152: 280-295.
- Lenschow, D. J., Walunas, T. L. and Bluestone, J. A., CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996. 14: 233-258.
- Lesley, J. and Trowbridge, I. S., Genetic characterization of a polymorphic murine cell-surface glycoprotein. *Immunogenetics* 1982. 15: 313-320.
- Lim, H. W. and Kim, C. H., Loss of IL-7 receptor alpha on CD4⁺ T cells defines terminally differentiated B cell-helping effector T cells in a B cell-rich lymphoid tissue. *J Immunol* 2007. 179: 7448-7456.
- Lin, H. and Grosschedl, R., Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* 1995. 376: 263-267.
- Ling, V., Wu, P. W., Finnerty, H. F., Bean, K. M., Spaulding, V., Fouser, L. A., Leonard, J. P., Hunter, S. E., Zollner, R., Thomas, J. L., Miyashiro, J. S., Jacobs, K. A. and Collins, M., Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J Immunol* 2000. 164: 1653-1657.
- Liu, Y. J., Zhang, J., Lane, P. J., Chan, E. Y. and MacLennan, I. C., Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol* 1991. 21: 2951-2962.
- Liu, Y. J., Johnson, G. D., Gordon, J. and MacLennan, I. C., Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. *Immunol Today* 1992. 13: 17-21.
- Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C. and Carsetti, R., B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med* 1999. 190: 75-89.
- Logue, E. C., Bakkour, S., Murphy, M. M., Nolla, H. and Sha, W. C., ICOS-induced B7h shedding on B cells is inhibited by TLR7/8 and TLR9. *J Immunol* 2006. 177: 2356-2364.
- Löhning, M., Hutloff, A., Kallinich, T., Mages, H. W., Bonhagen, K., Radbruch, A., Hamelmann, E. and Kroczeck, R. A., Expression of ICOS in vivo defines CD4⁺ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J Exp Med* 2003. 197: 181-193.
- Lyons, A. B. and Parish, C. R., Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994. 171: 131-137.
- Mackay, F., Woodcock, S. A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschoop, J. and Browning, J. L., Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 1999. 190: 1697-1710.
- Mackay, F. and Browning, J. L., BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nat Rev Immunol* 2002. 2: 465-475.
- MacLennan, I. C., Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994. 12: 117-139.
- MacLennan, I. C., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M., Zuniga, E., Cook, M. C. and Vinuesa, C. G., Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 2003. 194: 8-18.
- Mages, H. W., Hutloff, A., Heuck, C., Buchner, K., Himmelbauer, H., Oliveri, F. and Kroczeck, R. A., Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand. *Eur J Immunol* 2000. 30: 1040-1047.
- Mahajan, S., Cervera, A., MacLeod, M., Fillatreau, S., Perona-Wright, G., Meek, S., Smith, A., MacDonald, A. and Gray, D., The role of ICOS in the development of CD4 T cell help and the reactivation of memory T cells. *Eur J Immunol* 2007. 37: 1796-1808.
- Mak, T. W., Shahinian, A., Yoshinaga, S. K., Wakeham, A., Boucher, L. M., Pintilie, M., Duncan, G., Gajewska, B. U., Gronski, M., Eriksson, U., Odermatt, B., Ho, A., Bouchard, D., Whorisky, J. S., Jordana, M., Ohashi, P. S., Pawson, T., Bladt, F. and Tafuri, A., Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nat Immunol* 2003. 4: 765-772.
- Manser, T., Textbook germinal centers? *J Immunol* 2004. 172: 3369-3375.
- McAdam, A. J., Chang, T. T., Lumelsky, A. E., Greenfield, E. A., Boussiotis, V. A., Duke-Cohan, J. S., Chernova, T., Malenkovich, N., Jabs, C., Kuchroo, V. K., Ling, V., Collins, M., Sharpe, A. H. and Freeman, G. J., Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2000. 165: 5035-5040.

- McAdam, A. J., Greenwald, R. J., Levin, M. A., Chernova, T., Malenkovich, N., Ling, V., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H., ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 2001. 409: 102-105.
- McHeyzer-Williams, L. J., Driver, D. J. and McHeyzer-Williams, M. G., Germinal center reaction. *Curr Opin Hematol* 2001. 8: 52-59.
- McHeyzer-Williams, L. J. and McHeyzer-Williams, M. G., Developmentally distinct Th cells control plasma cell production in vivo. *Immunity* 2004. 20: 231-242.
- McHeyzer-Williams, L. J., Malherbe, L. P. and McHeyzer-Williams, M. G., Checkpoints in memory B-cell evolution. *Immunol Rev* 2006. 211: 255-268.
- Meyer-Bahlburg, A., Andrews, S. F., Yu, K. O., Porcelli, S. A. and Rawlings, D. J., Characterization of a late transitional B cell population highly sensitive to BAFF-mediated homeostatic proliferation. *J Exp Med* 2008. 205: 155-168.
- Meyer-Hermann, M. E., Maini, P. K. and Iber, D., An analysis of B cell selection mechanisms in germinal centers. *Math Med Biol* 2006. 23: 255-277.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S. and Papaioannou, V. E., RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992. 68: 869-877.
- Nabavi, N., Freeman, G. J., Gault, A., Godfrey, D., Nadler, L. M. and Glimcher, L. H., Signalling through the MHC class II cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression. *Nature* 1992. 360: 266-268.
- Nakanishi, K., Malek, T. R., Smith, K. A., Hamaoka, T., Shevach, E. M. and Paul, W. E., Both interleukin 2 and a second T cell-derived factor in EL-4 supernatant have activity as differentiation factors in IgM synthesis. *J Exp Med* 1984. 160: 1605-1621.
- Nitschke, L., Carsetti, R., Ocker, B., Kohler, G. and Lamers, M. C., CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol* 1997. 7: 133-143.
- Nitschke, L., Kosco, M. H., Kohler, G. and Lamers, M. C., Immunoglobulin D-deficient mice can mount normal immune responses to thymus-independent and -dependent antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. 90: 1887-1891.
- Nurieva, R. I., Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS-B7h interaction. *Clin Immunol* 2005. 115: 19-25.
- Nutt, S. L., Thevenin, C. and Busslinger, M., Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development. *Immunobiology* 1997. 198: 227-235.
- Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C. and Baltimore, D., RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990. 248: 1517-1523.
- Ortega, G., Robb, R. J., Shevach, E. M. and Malek, T. R., The murine IL 2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells. *J Immunol* 1984. 133: 1970-1975.
- Osmond, D. G., Proliferation kinetics and the lifespan of B cells in central and peripheral lymphoid organs. *Curr Opin Immunol* 1991. 3: 179-185.
- Osmond, D. G., The turnover of B-cell populations. *Immunol Today* 1993. 14: 34-37.
- Ozkaynak, E., Gao, W., Shemmeri, N., Wang, C., Gutierrez-Ramos, J. C., Amaral, J., Qin, S., Rottman, J. B., Coyle, A. J. and Hancock, W. W., Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection. *Nat Immunol* 2001. 2: 591-596.
- Pape, K. A., Kouskoff, V., Nemazee, D., Tang, H. L., Cyster, J. G., Tze, L. E., Hippen, K. L., Behrens, T. W. and Jenkins, M. K., Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response. *J Exp Med* 2003. 197: 1677-1687.
- Pape, K. A., Catron, D. M., Itano, A. A. and Jenkins, M. K., The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* 2007. 26: 491-502.
- Parry, R. V., Rumbley, C. A., Vandenbergh, L. H., June, C. H. and Riley, J. L., CD28 and inducible costimulatory protein Src homology 2 binding domains show distinct regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, Bcl-xL, and IL-2 expression in primary human CD4 T lymphocytes. *J Immunol* 2003. 171: 166-174.
- Pillai, S., Cariappa, A. and Moran, S. T., Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 2005. 23: 161-196.
- Reichman-Fried, M., Hardy, R. R. and Bosma, M. J., Development of B-lineage cells in the bone marrow of scid/scid mice following the introduction of functionally rearranged immunoglobulin transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990. 87: 2730-2734.
- Reth, M., Hammerling, G. J. and Rajewsky, K., Analysis of the repertoire of anti-NP antibodies in C57BL/6 mice by cell fusion. I. Characterization of antibody families in the primary and hyperimmune response. *Eur J Immunol* 1978. 8: 393-400.

5. Literaturverzeichnis

- Reth, M., Imanishi-Kari, T. and Rajewsky, K., Analysis of the repertoire of anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies in C 57 BL/6 mice by cell fusion. II. Characterization of idiotopes by monoclonal anti-idiotope antibodies. *Eur J Immunol* 1979. 9: 1004-1013.
- Rogers, P. R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N. and Croft, M., OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 2001. 15: 445-455.
- Rolink, A. G., Schaniel, C., Andersson, J. and Melchers, F., Selection events operating at various stages in B cell development. *Curr Opin Immunol* 2001. 13: 202-207.
- Saijo, K., Schmedt, C., Su, I. H., Karasuyama, H., Lowell, C. A., Reth, M., Adachi, T., Patke, A., Santana, A. and Tarakhovskiy, A., Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development. *Nat Immunol* 2003. 4: 274-279.
- Saito, T., Negative regulation of T cell activation. *Curr Opin Immunol* 1998. 10: 313-321.
- Salzer, U., Maul-Pavicic, A., Cunningham-Rundles, C., Urschel, S., Belohradsky, B. H., Litzman, J., Holm, A., Franco, J. L., Plebani, A., Hammarstrom, L., Skrabl, A., Schwinger, W. and Grimbacher, B., ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2004. 113: 234-240.
- Schaerli, P., Willmann, K., Lang, A. B., Lipp, M., Loetscher, P. and Moser, B., CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* 2000. 192: 1553-1562.
- Schiemann, B., Gommerman, J. L., Vora, K., Cachero, T. G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E. and Scott, M. L., An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 2001. 293: 2111-2114.
- Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J. L., Holler, N., Ambrose, C., Lawton, P., Bixler, S., Acha-Orbea, H., Valmori, D., Romero, P., Werner-Favre, C., Zubler, R. H., Browning, J. L. and Tschoop, J., BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 1999. 189: 1747-1756.
- Schwartz, R. H., Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 1992. 71: 1065-1068.
- Schwickert, T. A., Lindquist, R. L., Shakhar, G., Livshits, G., Skokos, D., Kosco-Vilbois, M. H., Dustin, M. L. and Nussenzweig, M. C., In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* 2007. 446: 83-87.
- Sharpe, A. H. and Freeman, G. J., The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002. 2: 116-126.
- Shih, T. A., Meffre, E., Roederer, M. and Nussenzweig, M. C., Role of BCR affinity in T cell dependent antibody responses in vivo. *Nat Immunol* 2002b. 3: 570-575.
- Shih, T. A., Roederer, M. and Nussenzweig, M. C., Role of antigen receptor affinity in T cell-independent antibody responses in vivo. *Nat Immunol* 2002a. 3: 399-406.
- Shinall, S. M., Gonzalez-Fernandez, M., Noelle, R. J. and Waldschmidt, T. J., Identification of murine germinal center B cell subsets defined by the expression of surface isotypes and differentiation antigens. *J Immunol* 2000. 164: 5729-5738.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M. and et al., RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992. 68: 855-867.
- Sonoda, E., Pewzner-Jung, Y., Schwers, S., Taki, S., Jung, S., Eilat, D. and Rajewsky, K., B cell development under the condition of allelic inclusion. *Immunity* 1997. 6: 225-233.
- Sudo, T., Nishikawa, S., Ohno, N., Akiyama, N., Tamakoshi, M. and Yoshida, H., Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. 90: 9125-9129.
- Swallow, M. M., Wallin, J. J. and Sha, W. C., B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity* 1999. 11: 423-432.
- Tafari, A., Shahinian, A., Bladt, F., Yoshinaga, S. K., Jordana, M., Wakeham, A., Boucher, L. M., Bouchard, D., Chan, V. S., Duncan, G., Odermatt, B., Ho, A., Itie, A., Horan, T., Whoriskey, J. S., Pawson, T., Penninger, J. M., Ohashi, P. S. and Mak, T. W., ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 2001. 409: 105-109.
- Tanious, F. A., Veal, J. M., Buczak, H., Ratmeyer, L. S. and Wilson, W. D., DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 1992. 31: 3103-3112.
- Tarlinton, D., B-cell memory: are subsets necessary? *Nat Rev Immunol* 2006. 6: 785-790.
- Thompson, C. B. and Allison, J. P., The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* 1997. 7: 445-450.
- Thompson, J. S., Schneider, P., Kalled, S. L., Wang, L., Lefevre, E. A., Cachero, T. G., MacKay, F., Bixler, S. A., Zafari, M., Liu, Z. Y., Woodcock, S. A., Qian, F., Batten, M., Madry, C., Richard, Y., Benjamin, C. D., Browning, J.

- L., Tsapis, A., Tschopp, J. and Ambrose, C., BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. *J Exp Med* 2000. 192: 129-135.
- Tomonari, K., A rat antibody against a structure functionally related to the mouse T-cell receptor/T3 complex. *Immunogenetics* 1988. 28: 455-458.
- Torres, R. M., Flaswinkel, H., Reth, M. and Rajewsky, K., Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex. *Science* 1996. 272: 1804-1808.
- Tung, J. W., Parks, D. R., Moore, W. A. and Herzenberg, L. A., Identification of B-cell subsets: an exposition of 11-color (Hi-D) FACS methods. *Methods Mol Biol* 2004. 271: 37-58.
- Turner, M., Mee, P. J., Costello, P. S., Williams, O., Price, A. A., Duddy, L. P., Furlong, M. T., Geahlen, R. L. and Tybulewicz, V. L., Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 1995. 378: 298-302.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995. 184: 39-51.
- Villegas, E. N., Lieberman, L. A., Mason, N., Blass, S. L., Zediak, V. P., Peach, R., Horan, T., Yoshinaga, S. and Hunter, C. A., A role for inducible costimulator protein in the CD28- independent mechanism of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 2002. 169: 937-943.
- Vogelzang, A., McGuire, H. M., Yu, D., Sprent, J., Mackay, C. R. and King, C., A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity* 2008. 29: 127-137.
- Vu, F., Dianzani, U., Ware, C. F., Mak, T. and Gommerman, J. L., ICOS, CD40, and lymphotoxin beta receptors signal sequentially and interdependently to initiate a germinal center reaction. *J Immunol* 2008. 180: 2284-2293.
- Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., Thompson, C. B. and Bluestone, J. A., CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994. 1: 405-413.
- Walunas, T. L., Bakker, C. Y. and Bluestone, J. A., CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 1996. 183: 2541-2550.
- Wang, S., Zhu, G., Chapoval, A. I., Dong, H., Tamada, K., Ni, J. and Chen, L., Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood* 2000. 96: 2808-2813.
- Wang, Y. and Carter, R. H., CD19 regulates B cell maturation, proliferation, and positive selection in the FDZ zone of murine splenic germinal centers. *Immunity* 2005. 22: 749-761.
- Warnatz, K., Bossaller, L., Salzer, U., Skrabl-Baumgartner, A., Schwinger, W., van der Burg, M., van Dongen, J. J., Orlowska-Volk, M., Knoth, R., Durandy, A., Draeger, R., Schlesier, M., Peter, H. H. and Grimbacher, B., Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* 2006. 107: 3045-3052.
- Wong, S. C., Oh, E., Ng, C. H. and Lam, K. P., Impaired germinal center formation and recall T-cell-dependent immune responses in mice lacking the costimulatory ligand B7-H2. *Blood* 2003. 102: 1381-1388.
- Yoshinaga, S. K., Whoriskey, J. S., Khare, S. D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M. A., Kohno, T., Tafuri-Bladt, A., Brankow, D., Campbell, P., Chang, D., Chiu, L., Dai, T., Duncan, G., Elliott, G. S., Hui, A., McCabe, S. M., Scully, S., Shahinian, A., Shaklee, C. L., Van, G., Mak, T. W. and Senaldi, G., T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999. 402: 827-832.
- Yu, D., Tan, A. H., Hu, X., Athanasopoulos, V., Simpson, N., Silva, D. G., Hutloff, A., Giles, K. M., Leedman, P. J., Lam, K. P., Goodnow, C. C. and Vinuesa, C. G., Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA. *Nature* 2007. 450: 299-303.
- Zhuang, Y., Cheng, P. and Weintraub, H., B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB. *Mol Cell Biol* 1996. 16: 2898-2905.
- Zou, Y. R., Takeda, S. and Rajewsky, K., Gene targeting in the Ig kappa locus: efficient generation of lambda chain-expressing B cells, independent of gene rearrangements in Ig kappa. *EMBO J* 1993. 12: 811-820.

6 Anhang

6.1 Danksagungen

Mein Dank gilt an erster Stelle Herr Dr. Andreas Hutloff für die Überlassung des Themas, die Organisation der Finanzierung sowie die ausgezeichnete Betreuung der Dissertation mit unermüdlichem Einsatz und engagierte Diskussionsbereitschaft mit zahlreichen Ratschläge und Ideen.

Herr Prof. Dr. Richard Kroczeck danke für die hilfreichen Diskussionsbeiträge bei dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Andreas Radbruch danke ich für die freundliche Übernahme der Betreuung an der Humboldt Universität zu Berlin.

Petra Jahn, Ewa Kowalczyk und Katja Ranke, die trotz unzähligen Lymphknoten, Milzen, ELISA-Platten und Objektträgern immer einen klaren Kopf behalten haben, gilt ein besonderer Dank für die zuverlässige technische Unterstützung,

Den Tierpflegern des Robert-Koch Instituts Nicole Wagner, Patricia Mützlitz und Stefanie Redlich, die sich auch zu früher Stunde stets hilfsbereit und gutgelaunt ausgezeichnet haben, danke ich ganz herzlich für die intensive, tatkräftige Unterstützung bei tierexperimentellen Arbeiten.

Des Weiteren möchte ich meinen Dank für die Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe P21 aussprechen, besonders Dr. Volker Henn und Dr. Hans-Werner Mages, die mir mit engagierter Hilfsbereitschaft und Lösungsvorschlägen bei fachlichen Diskussionen beigestanden haben und für eine ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

6.2 Veröffentlichungen

Aus dieser Arbeit sind folgende Publikationen und Konferenzbeiträge hervorgegangen:

Originalpublikationen

Burmeister, Y., Lischke, T., **Dahler A. C.**, Mages H. W., Lam K.-P., Coyle A. J., Krocze R. A. und Hutloff A., ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol* 2008. 180: 774-782.

Kongressbeiträge

Dahler A., Burmeister Y., Krocze R. A., Hutloff A., Establishment of an *in vivo* system to analyze T/B cooperation on a single cell level. *16th European Congress of Immunology* 6.-9. September 2006. Paris (Poster).

Burmeister, Y., Lischke, T., **Dahler A. C.**, Mages H. W., Lam K.-P., Coyle A. J., Krocze R. A. und Hutloff A., ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *37th Annual Meeting of the German Society for Immunology* 5.-8. September 2006, Heidelberg (Poster/Vortrag).

Burmeister, Y., Lischke, T., **Dahler A. C.**, Mages H. W., Lam K.-P., Coyle A. J., Krocze R. A. und Hutloff A., ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *German Meeting on Th1/Th2 research* 18.-19. Juni 2008. Marburg (Vortrag).

6.3 Erklärung

Hiermit versichere ich, Anja Christina Dahler geb. 01.05.1980 in Rodalben an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen als solche ausgewiesen zu haben.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war, sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Die dem angestrebten Promotionsverfahren an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 04. Juni 2009

Anja Christina Dahler